

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:**

102 56 381.0

**Anmeldetag:**

02. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:**

BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:**

L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme

**IPC:**

C 12 N 15/70

**CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT**

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Dezember 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT**

Letang

BEST AVAILABLE COPY

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man

- a) mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares, DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und
- b) prokaryontischen Wirtszellen selektioniert, welche besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten und
- c) die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose zu einer Kultur besagter selektionierter Wirtszellen induziert,

dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase.

- 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die prokaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus den Arten der Familie der Enterobacteriaceae oder der Ordnung Actinomycetales.
- 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die prokaryontische Wirtszelle Escherichia coli ist.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der L-Rhamnose-induzierbare Promotor der rha<sub>PBAD</sub>-Promotor aus E. coli oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten ist.
- 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der L-Rhamnose-induzierbare Promotor zumindest ein RhaS-Bindeelement gemäß SEQ ID NO: 5 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten enthält.
- 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der L-Rhamnose-induzierbare Promotor mindestens eine Sequenz beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3 oder 4 enthält.



## 2

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die L-Rhamnose-Isomerase durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 9 oder ein funktionelles Äquivalent derselben beschrieben ist..
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das episomal replizierbare DNA-Konstrukt eine Größe von maximal 100000 Basen bzw. Basenpaaren hat.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das episomal replizierbare DNA-Konstrukt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus zirkulären Plasmidvektoren, Phagemiden und Cosmiden.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die prokaryontische Wirtszelle mindestens eine weitere Defizienz in Bezug auf ein Gene aufweist, das eine Funktion der der Rhamnose-Metabolisierung hat, wobei besagtes Gen für ein Protein kodiert ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Rhamnulose-1-Phosphatase (RhaB) und der Rhamnulosephosphat-Aldolase (RhaD).
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Expression der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz die Produktion eines durch besagte Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins bedingt.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz für ein rekombinantes Protein kodiert ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Chymosinen, Proteasen, Polymerasen, Saccharidasen, Dehydrogenasen, Nukleasen, Glucanasen, Glucoseoxidasen,  $\alpha$ -Amylasen, Oxidoreduktasen, Peroxidasen, Laccasen, Xylanasen, Phytasen, Cellulasen, Collagenasen, Hemicellulasen, Lipasen, Lactasen, Pectinasen, Amiloglucosidasen, Glucoamylasen, Pullulasen, Glucoseisomerasen, Nitrilasen, Collagenasen, Cellulasen, Serumalbuminen, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Gewebeplasminogenfaktoren, Protein C, von Willebrand-Faktoren, antiThrombinen, Erythropoietinen, "Colony Stimulating Factors", Cytokinen, Interleukinen, Insulinen, Integrine, Adressine, Selectinen, Antikörpern, Antikörperfragmenten, Strukturproteinen, Collagen, Fibroinen, Elastinen, Tubulinen, Actinen, Myosinen, Wachstumsfaktoren, Zellzyklusproteinen, Impfstoffen, Fibrinogenen und Thrombinen.
- 30 13. Prokaryontische Wirtszelle, die zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtszelle replizierbares DNA-Konstrukt enthält, welches eine
- 35
- 40
- 45

3.

zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfaßt, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

5

14. Verwendung einer prokarontischen Wirtszellen nach Anspruch 13 zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Enzymen, Chemikalien, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

10 15. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen und Feinchemikalien unter Einsatz einer prokaryontischen Wirtszellen gemäß Anspruch 13 oder einer Präparationen derselben.

15

20

25

30

35

40

45

## L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose induziert, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase. Die Erfindung betrifft ferner prokaryontische Wirtszellen, die zumindest defizient sind in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtszelle replizierbares DNA-Konstrukt enthalten, welches eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfaßt, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

Die heterologe Expression von Genen ist eine ökonomische Möglichkeit, Enzyme und andere Proteine für pharmazeutische und industrielle Verwendungszwecke herzustellen. Besagte Expressionen werden nach wie vor überwiegend mit Stämmen von *Escherichia coli* realisiert. Zur Herstellung rekombinanter Proteine sind eine Vielzahl von Systemen bekannt, die sich unterschiedlicher Wirtsorganismen und Genexpressionskassetten bedienen. Obgleich zahlreiche Systeme und Verfahren zur Expression rekombinanter Proteine in mikrobiellen Systemen beschrieben sind, basieren die Expressionssysteme für gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* auf einem sehr limitierten Repertoire bakterieller Promotoren. Am verbreitetsten sind der Laktose-Promotor [lac] (Yanisch-Perron et al. (1985) *Gene* 33: 103-109) und der Tryptophan-Promotor [trp] (Goeddel et al. (1980) *Nature* (London) 287: 411-416) sowie Hybridpromotoren der vorgenannten [lac und trc] (Brosius (1984) *Gene* 27:161-172; Amanna & Brosius (1985) *Gene* 40: 183-190). Weitere Beispiele sind die Promotoren PL und PR des  $\lambda$ -Phagen (Elvin et al. (1990) *Gene* 37:123-126), der Phage T7-Promotor (Tabor & Richardson (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1074-1078) und der Promotor der alkalischen Phosphatase [pho] (Chang et al. (1986) *Gene* 44:121-125).

Mit der heterologen Expression sind verschiedene Probleme wie beispielsweise die Toxizität des Genproduktes, zu geringe Expressionsraten oder Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten

- ("inclusion bodies") verbunden. Viele der oben beschriebenen Promotoren sind für Anwendungen ungeeignet, bei denen das zu exprimierende rekombinante Protein eine toxische Wirkung auf den jeweiligen Wirt hat. In diesen Fällen ist eine möglichst strikte Regulation der Expression wünschenswert. Dazu können sogenannte induzierbare Promotorsysteme eingesetzt werden, die mittels Zugabe eines Induktors oder eines anderen exogenen Stimulus (z.B. Hitze) induziert werden können. Besagte induzierbare Promotorsysteme bestehen in der Regel aus einer Promotor/Regulator-Kombination, wobei der Regulator beispielsweise ein Protein darstellt, welches in Kombination mit einem exogenen Stimulus die Transkription ausgehend von dem entsprechenden Promotor induziert. Beispielshaft zu nennen ist die Kombination eines Promotors mit einem Repressor wie z.B. dem lac-Repressor (Studier FW et al. (1990) Methods in Enzymol 185:60-89; Dubendorff JW & Studier FW (1991) J Mol Biol 219:45-59). Die reprimierende Wirkung dieses Repressor kann durch Zugabe eines natürlichen Induktors (z.B. Laktose) oder eines künstlichen Induktors (z.B. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid; IPTG) aufgehoben und die Expression so initiiert werden.
- 20 IPTG kann im Gegensatz zu Laktose nicht verstoffwechselt werden und gewährt so eine langanhaltende Induktion. Ein weiteres Beispiel für diese induzierbaren Promotoren ist der durch Arabinose induzierbare araB Promotor (US 5,028,530; Guzman LM et al. (1995) J Bacteriol 177:4121-4130).
- 25 IPTG und andere synthetische Induktoren sind sehr teuer und wirken sich teilweise nachteilig auf das Wachstum der Organismen aus, was eine Anwendung im großindustriellen Maßstab unrentabel macht.
- 30 Physiologische Induktoren wie Aminosäuren (z.B. Tryptophan) und Zucker (Arabinose) sind in der Regel zwar billiger, werden aber vom Organismus verstoffwechselt, so dass sie in einer Zellanzucht, insbesondere bei Hochdichtezellfermentationen, in erheblichen Mengen hinzugefügt und/oder nachträglich zugesetzt werden müssen. Außerdem können Metaboliten dieser Verbindungen auch schädlich für die weitere Anzucht sein, z.B. bei der Entstehung von Acetat aus Zuckern.
- 40 WO 01/73082 beschreibt ein Verfahren zur Expression rekombinanter Proteine unter Kontrolle des induzierbaren araB Promotors in einem E.coli Wirtsorganismus, der eine Defizienz für den aktiven Transport des Induktors Arabinose aufweist. Als Vorteil wird hier geltend gemacht, dass kein aktiver Transport sondern lediglich passiver Transport (durch Diffusion) stattfinden kann. Dadurch
- 45 kann die intrazelluläre Arabinose-Konzentration und somit auch die Expressionsinduktion besser kontrolliert werden. In einigen

der aufgeführten Beispiele wird ein E.coli Stamm (E104) eingesetzt, der eine Defizienz in den Arabinose-metabolisierenden Enzymen Ribulokinase (AraB) und L-Ribulose-5-phosphat-4-Epimerase (AraD) aufweist. Gemäß den Expressionsdaten hat diese Defizienz jedoch keine wesentliche Auswirkung auf die Expressionshöhen. Das Arabinose-induzierbare System hat verschiedene Nachteile:

- 10 a) Arabinose hat bereits ab Konzentrationen von größer 0,1 mM einen wachstumshemmenden Effekt auf die Bakterienkultur, der auch mit dem in WO 01/73082 beschriebenen Verfahren nur bedingt kompensiert werden kann (vgl. Tabelle 4, WO 01/73082).
- 15 b) Der Arabinose-induzierbare Promotor ist in Abwesenheit von Arabinose nicht gänzlich inaktiv, sondern besitzt eine recht hohe Basisaktivität (vgl. Tabelle 5, WO 01/73082).
- c) Die Qualität der exprimierten rekombinanten Proteine ist abhängig von der Zelldichte und nimmt mit zunehmenden Zelldichten ab (De Lisa MP et al. (1999) Biotechnol Bioeng 65:54-64).

20 Beschrieben ist der Escherichia coli Stamm JB1204 (CGSC6999, Bulawa & Raetz (1984) J Biol Chem 259:11257-11264), der die Transposoninsertion "rha-14::Tn10" aufweist, wobei zur Sequenz oder Funktion von "rha-14" keine genaueren Angaben gemacht  
25 werden.

Die Ausnahme und Verstoffwechslung von L-Rhamnose in Bakterien wie E.coli ist beschrieben. L-Rhamnose wird über ein aktives Transportsystem (RhaT) in die Zellen aufgenommen, mit einer Isomerase (RhaA) in L-Rhamnulose überführt, die dann weiter durch  
30 die Rhamnulose-1-Phosphatase (RhaB) phosphoryliert und durch eine Aldolase (RhaD) zu Dihydroxyacetonphosphat und Lactaldehyd hydrolysiert wird. Die Gene rhaBAD bilden ein Operon und werden mit Hilfe des sogenannten rhaP<sub>BAD</sub>-Promotors transkribiert. Das Rhamnose-  
35 sesystems zeichnet sich gegenüber anderen Systemen dadurch aus, dass zwei Aktivatoren RhaS und RhaR zur Regulation erforderlich sind. Beide bilden eine Transkriptionseinheit und werden entgegengesetzt zu rhaBAD transkribiert. In Anwesenheit von L-Rhamnose bindet RhaR an den rhaP<sub>RS</sub>-Promotor und initiiert seine eigene  
40 Expression als auch die RhaS-Expression. RhaS wiederum bindet nach Aktivierung durch L-Rhamnose als Effektor an den rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor und den separaten rhaP<sub>T</sub>-Promotor des rhaT-Gens und aktiviert die Transkription der Strukturgene (Moralejo P et al. (1993) J Bacteriol 175:5585-5594; Tobin JF et al. (1990) J Mol Biol  
45 211:1-4; Chen YM et al. (1987) J Bacteriol 169:3712-3719; Egan SM et al. (1993) J Mol Biol 243:87-98). Die Kombination zweier Aktivatoren bedingt eine ungewöhnlich strikte Expressionskontrolle

durch den rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor. Ein Vergleich des Arabinose-induzierbaren araB-Promotors und des Rhamnose-induzierbaren rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor zeigt, dass letzterer wesentlich strikter reguliert ist und in Abwesenheit des Induktors Rhamnose quasi einen Null-Phänotyp repräsentiert (Haldimann A et al. (1998) J Bacteriol 180(5):1277-1286).

WO 01/32890 beschreibt die Herstellung von L-Pantolacton-Hydrolase mit Escherichia coli TG1 pDHE681 bzw. Derivaten, wobei

- 10 L-Rhamnose als Induktor für die Genexpression des Enzyms eingesetzt wird. Da L-Rhamnose von E. coli gut verstoffwechselt wird, muß die umgesetzte L-Rhamnose durch Zufütterung nachgeführt werden. Dies bedeutet einen erheblichen experimentellen Aufwand und erhöht die Kosten für das Anzuchtmedium.
- 15 Beschrieben sind ferner Expressionssysteme zur Fermentation unter hohen Zelldichten unter Verwendung des L-Rhamnose-induzierbaren rhaB<sub>AD</sub>-Promotors und eines E.coli Stamm, der eine gezielt-eingeführte Defizienz in der L-Rhamnulosekinase (rhaB) aufweist
- 20 (Stumpp T et al. (2000) Biospectrum 6(1):33-36; Wilms B et al. (2001) Biotechnol Bioeng 73(2): 95-103). RhaB wurde hier bewußt ausgewählt, da es der erste irreversible Schritt der Metabolisierung von L-Rhamnose ist (vgl. Wilms B et al. (2001) Biotechnol Bioeng 73(2) S.98, linke Spalte, Z.4-8). Eine optimale Induktion
- 25 kann in diesen System mit L-Rhamnose-Konzentrationen von 2 g/L erreicht werden (vgl. Wilms B et al. (2001) Biotechnol Bioeng 73(2) S.102, linke Spalte, 2. Absatz Z.1-4). Diese Konzentrationen sind immer noch sehr hoch. Bei einem durchschnittlichen Preis von ca. 100 €/kg L-Rhamnose würden bei einem 10 m<sup>3</sup> Fermenter noch
- 30 Kosten von 2000 € nur für die L-Rhamnose anfallen.

- Beschrieben sind ferner eng-regulierte Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme, bei denen mittels homologer Rekombination das hinter dem endogenen rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor lokalisierte Rhamnose-Operon
- 35 (BAD) gegen das PhoB-Gen (Transkriptionsaktivator) ausgetauscht wurde (Haldimann A et al. (1998) J Bacteriol 180(5):1277-1286). Das hier beschriebene System ist zwar gut geeignet, um Regulatorstudien zu betreiben, da eine sehr enge Regulation gewährleistet ist. Es ist jedoch zur Überexpression - insbesondere unter hoch-
  - 40 dichten Zellkulturbedingungen - wenig geeignet, da - aufgrund des Austausches des chromosomalen Rhamnose-Operons - jeweils nur eine Kopie der rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor gesteuerten Expressionskassette eingebracht werden kann. Ferner ist der Austausch von Genen mittels homologer Rekombination aufwendig und erfordert eine mühsame
  - 45 Selektion und Charakterisierung entsprechend modifizierter Orga-



## 5

nismen. Dies macht das beschriebene Verfahren untauglich für den Routineeinsatz.

Es stellte sich die Aufgabe, ein verbessertes Verfahren für die Expression von Nukleinsäuren - und bevorzugt rekombinanten Proteinen - bereitzustellen, was mit geringen L-Rhamnose-Mengen hohe Expressionspiegel ergibt. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

10 Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man

15 a) mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares, DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und

20 b) prokaryontischen Wirtszellen selektioniert, welche besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten und

25 c) die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose zu einer Kultur besagter selektionierter Wirtszellen induziert,

dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform bedingt die Expression der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz die Produktion eines durch besagte Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, so dass das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine  
35 eingesetzt werden kann.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform kann eine zusätzliche Defizienz in einem oder mehreren weiteren L-Rhamnose-metabolisierenden bzw. transportierenden Proteinen vorliegen.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine prokaryontische Wirtszelle, die zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtszelle replizierbares DNA-Konstrukt enthält, welches eine zu exprimierende  
45 Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines

durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfaßt, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann die erfindungsgemäße prokaryontische Wirtszelle eine zusätzliche Defizienz in einem oder mehreren weiteren L-Rhamnose-metabolisierenden bzw. transportierenden Proteinen vorliegen.

Ausserdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen und anderen Feinchemikalien wie beispielsweise chiraler Carbonsäuren unter Einsatz einer der erfindungsgemäßen prokaryontischen Wirtszellen oder einer Präparationen derselben.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren hat verschiedene Vorteile:

1. Es ist einfach anzuwenden, da ausgehend von einem Wirtsstamm durch einfache Transformation der entsprechende Expressionsstamm generiert werden kann, ohne dass eine Insertion mittels homologer Rekombination in das Genom (wie bei Haldimann A et al. (1998) J Bacteriol 180(5):1277-1286) und eine aufwendige Selektion korrekt modifizierter Organismen erforderlich wäre.
- 25 2. Die im Rahmen der Erfindung zur Verfügung gestellten Expressionskassetten und -vektoren sind leicht handhabbar. Der beispielhaft eingesetzte rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor hat eine Länge von lediglich 123 Basenpaaren.
- 30 3. Da L-Rhamnose, insbesondere bei C-Quellen-limitierten Fermentationen, von E.coli verstoffwechselt wird, entsteht bei Standardverfahren ein hoher Verbrauch von L-Rhamnose (Zufütterung) und damit hohe Mediumskosten. Durch den niedrigen L-Rhamnose-Bedarf des erfindungsgemäßen Verfahrens (<1 % im Vergleich zu L-Rhamnose-metabolisierenden Stämmen) werden die Kosten für das Fermentationsmedium und damit die Biokatalysator-Herstellung erheblich gesenkt. Durch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist die Herstellung rekombinanter Proteine (z.B. Nitrilase, L-Pantolacton-Hydrolase) durch Hochdichtezell-Fermentation (z.B. der bereitgestellten E.coli-TG10-Stämme) ohne laufende Rhamnose-Zufütterung möglich.
4. Die Regulation des beschriebenen Systems erwies sich als außergewöhnlich dicht und ergab bereits bei sehr geringen Konzentrationen des Induktors L-Rhamnose von bis zu 0,05 g/l nach wie vor die maximale Induktion, während bei Abwesenheit

des Induktors keinerlei Promotoraktivität detektiert werden konnte. Damit eignet sich das System auch hervorragend für die Expresssion potentiell toxischer Proteine und ermöglicht eine kostengünstige Produktion insbesondere unter industriellen Bedingungen, da nur geringe L-Rhamnose-Konzentrationen erforderlich sind.

10 "Prokaryontische Wirtzelle" oder "prokaryontischer Wirtsorganismus" meint im Rahmen dieser Erfindung gram-positive oder gram-negative Bakterien, insbesondere solche gram-positive oder gram-negative Bakterien, die natürlicherweise in der Lage sind L-Rhamnose als Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. L-Rhamnose kann von den meisten prokaryotischen Organismen als Kohlenstoffquelle genutzt werden.

15 Bevorzugt meint prokaryontische Wirtzelle oder prokaryontischer Wirtsorganismus alle Gattungen und Arten der Enterobacteriaceae oder Familien und der Ordnung Actinomycetales, ganz besonders bevorzugt die Enterobacteriaceae Arten Escherichia, Serratia, 20 Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Edwardsiella, Citrobacter, Morganella, Providencia und Yersinia.

Ferner bevorzugt sind die Arten Pseudomonas, Burkholderia, Nocardia, Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, 25 Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus und Penicillium.

Am meisten bevorzugt sind Escherichia Arten, insbesondere Escherichia coli.

30 "L-Rhamnose-induzierbaren Promotor" meint allgemein all solche Promotoren die in Gegenwart von L-Rhamnose eine höhere Expressionsaktivität aufweisen, als in Abwesenheit von L-Rhamnose. Die Expression ist in Gegenwart von L-Rhamnose mindestens doppelt so 35 hoch, bevorzugt mindestens fünfmal so hoch, ganz besonders bevorzugt mindestens zehnmal so hoch, am meisten bevorzugt mindestens einhundertmal so hoch wie in Abwesenheit von L-Rhamnose. Bevorzugt werden im Rahmen der Ermittlung der Expressionshöhe solche Nukleinsäuresequenzen in funktioneller Verknüpfung mit dem zu 40 prüfenden Promotor eingesetzt, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporterproteine (Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1): 29-44) wie "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques 23(5):912-8), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Millar 45 et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414),  $\beta$ -Glucuronidase

oder  $\beta$ -Galactosidase.

Dabei kann die Konzentration von L-Rhamnose in dem Medium allgemein in einem Bereich von ungefähr 0,0001 g/l bis ungefähr

- 5 50 g/l, bevorzugt 0,001 g/l bis 5 g/l, besonders bevorzugt 0,01 g/l bis 0,5 g/l liegen.

Insbesondere bevorzugt ist der rhaP<sub>BAD</sub>-Promotor aus dem L-Rhamnose-Operon rhaBAD in E. coli (Egan & Schleif (1994) J Mol Biol  
10 243:821-829), sowie seine funktionellen Äquivalente aus anderen prokaryontischen Organismen, insbesondere Organismen der Enterobacteriaceae Familie.

Ganz besonders bevorzugt sind Promotoren, die mindestens ein  
15 RhaS-Bindeelement gemäß SEQ ID NO: 5 oder ein funktionelles Äquivalent desselben als auch ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten enthalten.

Insbesondere bevorzugt sind Promotoren die eine Sequenz gemäß  
20 SEQ ID NO: 2, 3 oder 4 enthalten sowie funktionelle Äquivalente derselben als auch funktionell äquivalente Fragmente der vorgenannten.

Funktionelle Äquivalente zu einem Promotor umfassend eine Sequenz  
25 gemäß SEQ ID NO: 2, 3, 4 oder 5 umfassen bevorzugt solche Promotoren, die

a) im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 3, 4 oder 5  
30 aufweisen und

b) eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz des besagten Promotors aufweisen, wo-  
35 bei sich die Homologie über eine Länge von von mindestens 30 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Basenpaaren erstreckt.

Funktionelle Äquivalente zu einem Promotor umfassend eine Sequenz  
40 gemäß SEQ ID NO: 2, 3, 4 oder 5 meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen des besagten Promotors sowie homologe Sequenzen und funktionell äquivalente Sequenzen aus anderen Organismen, bevorzugt aus anderen prokaryontischen Organismen, insbesondere Organismen der Enterobacteriaceae Familie, die im wesent-  
45

lichen die gleiche Promotoraktivität wie der besagte Promotor aufweisen.

5 "Im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität" meint die Induzierbarkeit der Expressionsaktivität durch L-Rhamnose nach der oben gegebenen allgemeinen Definition für L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren.

10 Wie oben beschrieben, bindet das RhaR-Protein in Anwesenheit von L-Rhamnose an den  $rhaP_{RS}$ -Promotor und initiiert seine eigene Expression als auch die RhaS-Expression. RhaS wiederum bindet mit L-Rhamnose als Effektor an den  $rhaP_{BAD}$ -Promotor und aktiviert dann den  $rhaP_{BAD}$ -Promotor und somit die Transkription der durch besagten Promotor regulierten Nukleinsäuresequenzen. Dieser vorge-  
15 schaltete Regulationsapparat - bestehend aus RhaR, RhaS und dem  $rhaP_{RS}$ -Promotor - können durch den prokaryotischen Wirtsorganismus natürlicherweise bereitgestellt, durch gentechnische Verfahren in dessen Genom insertiert oder aber mittels des im Rahmen der Erfindung eingesetzten DNA-Konstruktes zur Verfügung gestellt werden.  
20 Eine in diesem Zusammenhang geeignete Promotorkassette ist die durch SEQ ID NO: 1 beschriebene Sequenz.

Sollte die für die Induktion in die Zelle erforderliche L-Rhamnose Aufnahme nicht ausreichen, kann es vorteilhaft sein in Organismen, die beispielsweise natürlicherweise keinen L-Rhamnose-  
25 Transporter exprimieren, diesen transgen zur Expression zu bringen. Bisherige Erfahrungen zeigen jedoch das der aktive Rhamnosetransport keine limitierende Größe für die Effizienz des erfindungsgemäßen Expressionssystems darstellen sollte.

30 "L-Rhamnose-Isomerase" meint allgemein all solche Proteine, die befähigt sind, L-Rhamnose in eine andere Hexose zu konvertieren. Bevorzugt meint L-Rhamnose-Isomerase, solche Proteine, die befähigt sind L-Rhamnose in L-Rhamnulose zu überführen (EC 5.3.1.14).  
35 Besonders bevorzugt ist das RhaA-Gen aus Organismen der Enterobacteriaceae Familie, insbesondere E.coli. Am meisten bevorzugt meint L-Rhamnose-Isomerase das Protein gemäß SEQ ID NO: 9, sowie homologe Sequenzen aus anderen Organismen, bevorzugt aus anderen prokaryontischen Organismen.

40 Funktionelle Äquivalente zu der L-Rhamnose-Isomerase gemäß SEQ ID NO: 9 umfasst bevorzugt solche Sequenzen die

a) im wesentlichen die gleiche Enzymaktivität wie die L-Rhamnose-Isomerase gemäß SEQ ID NO: 9 aufweisen und  
45

## 10

- b) die eine Homologie aufweisen von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz der L-Rhamnose-Isomerase gemäß SEQ ID NO: 9, wobei sich die Homologie über eine Länge von von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 200 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge des Proteins erstreckt.

Neben der L-Rhamnose-Isomerase können noch weitere Defizienzen in Bezug auf Gene vorliegen, die eine Funktion der L-Rhamnose-Metabolisierung haben. Insbesondere seien hierbei zu nennen Defizienz der Rhamnulose-1-Phosphatase/Kinase (z.B. RhaB; beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 11), eine Defizienz der Rhamnulophosphat-Aldolase (z.B. RhaD; beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 13) oder eine Defizienz in mindestens einem die Expression vorgenannter Proteine kontrollierenden regulatorischen Element (wie z.B. Promotor, Regulator o.ä.).

Unter Umständen kann es ferner vorteilhaft sein eine Defizienz in einem aktiven Rhamnose-Transportsystem (z.B. RhaT; beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 19) zu erzeugen.

"Defizienz" meint in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase oder ein anderes Enzym der L-Rhamnose-Aufnahme/Metabolisierung die im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Expression des entsprechenden Zielgens oder der von ihm abgeleiteten mRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes oder die Veränderung der Proteinsequenz des Genproduktes in einer Weise, das dessen Funktion und/oder Aktivität im wesentlichen unterbunden oder so geändert ist, dass L-Rhamnose im wesentlichen nicht mehr umgesetzt werden kann.

Eine Unterbindung oder Blockierung im Sinne der Erfindung umfasst insbesondere die mengenmässige Verringerung einer vom Zielgen exprimierten mRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen derselben. Dabei wird die Expression einer bestimmten mRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes in einer Zelle oder einem Organismus im Vergleich zu der selben Zelle oder Organismus, die dem Verfahren nicht unterworfen wurden, bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80%, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90 %, am meisten bevorzugt mehr als 95 % vermindert.

## 11

Ganz besonders bevorzugt meint Verminderung die vollständige Inaktivierung eines endogenen Gens ("knockout"-Mutation).

Eine Unterbindung oder Blockierung kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Bevorzugt beruht die Unterbindung oder Blockierung auf einer Mutation in dem entsprechenden Zielgen, wobei die Mutation in einer Substitution, Deletion und/oder Addition eines oder mehrerer Nukleotide bestehen kann. Besonders bevorzugt ist eine Unterbindung oder Blockierung mittels Transposon unterstützter Mutagenese oder mittels gezieltem Knock-out.

Die Verminderung kann durch dem Fachmann geläufigen Verfahren ermittelt werden. So kann die Verminderung der Proteinmenge beispielsweise durch immunologischen Nachweis des Proteins bestimmt werden. Weiterhin können biochemische Techniken wie Northern-Hybridisierung, "nuclease protection assay", Reverse Transkription (quantitative RT-PCR), ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"), Western-Blotting, Radioimmunoassay (RIA) oder andere Immunoassays sowie "fluorescence activated cell analysis" (FACS) eingesetzt werden. Je nach Art des verminderten Proteinproduktes kann auch dessen Aktivität oder der Einfluss auf den Phänotyp des Organismus oder der Zelle ermittelt werden.

"Proteinmenge" meinte die Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment.

"Verminderung" der Proteinmenge meint die Verminderung der Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter, Nährstoffzufuhr etc.). Die Verminderung beträgt dabei mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95%, am meisten bevorzugt mindestens 99 %. Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254).

## 12

Die Verminderung der L-Rhamnose-Isomerase Aktivität kann insbesondere mittels enzymatischer Testsysteme bestimmt werden. Entsprechende Testsysteme sind dem Fachmann bekannt (Bhuiyan SH et al. (1997) J Ferment Bioeng 84(4):319-323).

5

"In prokaryontischen Wirtszellen episomal replizierbares DNA-Konstrukt" meint all solche DNA-Konstrukte, welche unterschieden sind von der chromosomalen DNA der besagten Wirtszelle und parallel zu dieser in der besagten Wirtszelle existieren und befähigt sind in besagter Wirtszelle unter Verwendung zelleigener oder anderer (beispielsweise über das DNA-Konstrukt selber kodierter) Replikationsmechanismen zu replizieren. Das DNA-Konstrukt kann eine einzel- oder doppelsträngige DNA-Struktur darstellen. Bevorzugt hat das DNA-Konstrukt zumindest zeitweise (d.h. zu einem Zeitpunkt seines Replikationszyklus) eine doppelsträngige DNA-Struktur.

10

15

Bevorzugt liegen die besagten episomal replizierbaren DNA-Konstrukte in einer Kopienzahl von mindestens 1, bevorzugt mindestens 5, besonders bevorzugt mindestens 10 in einer Wirtszelle vor.

20

"Selektion prokaryontischer Wirtszellen, welche besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten" meint die Auswahl von Wirtszellen, die besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten. Die Auswahl kann beispielsweise unter Verwendung eines der unten beschriebenen Selektionsmarker realisiert werden. Bevorzugt insertiert das DNA-Konstrukt nicht in die chromosomale DNA der Wirtszelle. Dies kann beispielsweise dadurch verhindert werden, dass das DNA-Konstrukt keine Sequenzen aufweist, die über einen längeren Bereich identisch zu chromosomalen Sequenzen der Wirtszelle sind.

25

30

Bevorzugt haben besagte episomal replizierbaren DNA-Konstrukte eine Größe/Länge von maximal 100.000 Basen bzw. Basenpaaren, besonders bevorzugt maximal 50.000 Basen bzw. Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt 10.000 Basen bzw. Basenpaaren (die Angabe Basen bzw. basenpaaren richtet sich danach, ob das DNA-Konstrukt eine einzel- oder doppelsträngige DNA-Struktur darstellt).

35

40

Bevorzugt handelt es sich bei dem DNA-Konstrukt um einen Vektor. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren, Retroviren oder auch Agrobacterien sein. Bevorzugt ist der Vektor eine zirkuläres Plasmid, das die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz in rekombinanter Form umfasst und zu autonomer Replikation in der prokaryotischen Wirtszelle befähigt ist. Vektor kann im Rahmen dieser Erfindung auch als rekombinanter Vektor oder rekomb-

45



## 13

binanter Expressionsvektor bezeichnet werden. Verschiedene Sequenzen, die die Replikation von DNA in Prokaryonten erlauben sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Entsprechend geeignete Replikationsursprünge, die eine geringe Kopienzahl gewährleisten ("Low-Copy") können aus BAC (Bacterial artificial chromosomes), F-Plasmiden, Cosmiden wie z.B. pWE15 isoliert werden. Entsprechend geeignete Replikationsursprünge, die eine mittlere Kopienzahl gewährleisten ("Medium-Copy") können z.B. aus pBR322 (Lin-Chao S, Bremer H, Mol Gen Genet 1986 203(1): 143-149) und Derivate wie der pJOE-Serie, pKK223-3, pQE30, pQE40 oder Plasmiden mit einem R1 Ursprung wie pRSF1010 und Derivate wie z.B. pML122, p15A, pSC101 isoliert werden. Entsprechend geeignete Replikationsursprünge, die eine hohe Kopienzahl gewährleisten ("High-Copy") können z.B. aus Phagemiden wie pBluescript II SK/KS+/-, pGEM etc. isoliert werden. Die jeweils in einer Zelle vorliegende Kopienzahl wird zum Teil durch den sogenannten Replikationsursprung (auch Replikon genannt) bestimmt. Plasmide der pBR322 Serien enthalten den ColE1 Replikationsursprung aus pMB1. Dieser ist relativ streng kontrolliert und resultiert in einer Kopienzahl von ca. 25 pro Zelle. Plasmide der pUC umfassen eine mutierte ColE1 Version und können in 200 bis 700 Plasmidkopien pro Zelle vorliegen. Einige Plasmide umfassen den p15a Replikationsursprung, der in einer geringen Kopienzahl resultiert.

30 Als Vektoren seien beispielhaft zu nennen:

- a) in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.); pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI,
- 40 b) in Streptomyces sind bevorzugt pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361,
- c) in Bacillus sind bevorzugt pUB110, pC194 oder pBD214,
- 45 d) in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667,

oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vektors (Eds. Pouwels P. H. 5 et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

"Transformation" oder "transformiert" meint die Einführung genetischen Materials wie beispielsweise eines Vektors (z.B. ein 10 Plasmid) in eine prokaryotische Wirtszelle. Dazu stehen dem Fachmann verschiedene weiter unten im Detail beschriebene Verfahren zu Verfügung. Eine prokaryotische Wirtszelle, in die besagtes genetisches Material eingeführt wurde, als auch die aus dieser Zelle resultierenden "Nachkommen" und Kolonien, die besagtes 15 genetisches Material umfassen, werden als "Transformanten" bezeichnet.

"Transduktion" oder "transduziert" meint die Einführung genetischen Materials in eine prokaryotische Wirtszelle ausgehend von 20 dem genetischen Material eines Bakteriophagen. Eine prokaryotische Wirtszelle, in die besagtes genetisches Material eingeführt wurde, als auch die aus dieser Zelle resultierenden "Nachkommen" und Kolonien, die besagtes genetisches Material umfassen, werden als "Transduktanten" bezeichnet.

25 "Rekombinantes Protein" meint jedes Proteinprodukt, dass ausgehend von der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz unter funktioneller Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors exprimiert werden kann und schließt Peptide, Polypeptide, Proteine, 30 Oligoproteine und/oder Fusionsproteine ein. Bevorzugt meint "rekombinantes Protein" ein Protein mikrobiellen, bakteriellen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs.

"Fusionsproteine" meint eine Fusion aus dem gewünschten Protein 35 und Leitsequenzen die eine Expression in bestimmten Kompartimenten (z.B. Periplasma oder Cytoplasma) der Wirtszelle oder in das umgebende Medium ermöglichen. Beispielfhaft sei die pelB Leitsequenz zu nennen (US 5,576,195; US 5,846,818).

40 "Expressionskassette" meint jeweils die Kombination eines Promotors mit mindestens einer unter dessen Kontrolle transkribierbaren Nukleinsäuresequenz.

"Heterolog" meint in Bezug auf das Verhältnis des L-Rhamnose- 45 induzierbaren Promotors und der unter Kontrolle besagten Promotors zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, bzw. eine Expressionskassette oder einen Expressionsvektor alle solche durch gen-

## 15

technische Methoden zustande gekommene Konstruktionen, in denen entweder

- 5 a) mindestens eine der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen, oder
- b) mindestens einer der L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren, der die Expression besagter zu exprimierender Nukleinsäuresequenz steuert, oder
- 10 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung (beispielsweise an ihrem natürlichen chromosomalen Locus) befinden oder

15 durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste umfassen kann.

- 20 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die erfindungsgemäßen prokaryontischen Wirtszellen in einem Medium, dass das Wachstum dieser Organismen ermöglicht, angezüchtet. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine
- 25 Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelemente.

- Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Polyole wie
- 30 Glycerin, Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Laktose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Alkohole wie
- 35 Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie ein Aminosäurengemisch beispielsweise sog. Casamino acids (Difco) oder einzelne Aminosäuren wie Glyzin oder Asparaginsäure oder Aminosucker, die letztgenannten können auch gleichzeitig als
- 40 Stickstoffquelle verwendet werden. Besonders bevorzugt sind Polyole, insbesondere Glycerin.

- Bevorzugt sollte das eingesetzte Medium als Basismedium keine L-Rhamnose enthalten, um eine möglichst dichte Regulation der
- 45 Expression zu gewährleisten. Die L-Rhamnose wird dann im Bedarfsfall, zum gewünschten Zeitpunkt oder Zelldichte in der jeweils

gewünschten Konzentration zugefügt.

Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen  
5 enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen  
10 können.

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das  
15 Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfindungsgemässen Verfahren ist die Kontrolle der  $\text{Fe}^{2+}$ - oder  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionenkonzentration im Produktionsmedium.

20 Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Biotin, 2-KLG, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Prolin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Phenylalanin, Ornithin oder Valin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder  
25 Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die  
30 Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation kontinuierlich oder diskontinuierlich nachgegeben werden.

35

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, dass die Organismen so wachsen, dass die bestmöglichen Ausbeuten (zu ermitteln beispielsweise durch die Aktivitätsmenge des exprimierten rekombinaten Proteins) erreicht werden. Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15 °C bis 40 °C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C. Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von wenigen Stunden bis zu einigen Tagen bevorzugt von  
40 8 Stunden bis zu 21 Tagen, besonders bevorzugt von 4 Stunden bis

## 17

14 Tagen ausreichend. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die maximale Menge an Produkt im Medium an.

Wie Medien vorteilhaft optimiert werden können, kann der Fachmann  
5 beispielsweise dem Lehrbuch Applied Microbiol Physiology, "A Practical Approach (Eds. PM Rhodes, PF Stanbury, IRL-Press, 1997, Seiten 53 - 73, ISBN 0 19 963577 3) entnehmen.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich in batch- oder fed-batch-weise durchgeführt werden.

"Mutation" oder "Mutationen" meint die Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste bzw. Basen/Basenpaare.

15

"Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen meint die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils angegebene Sequenzlänge, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID  
30 NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

"Homologie" zwischen zwei Polypeptiden meint die Identität der  
35 Aminosäuresequenz über die jeweils angegebene Sequenzlänge, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

40

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

45 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 9 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit

der Sequenz SEQ ID NO: 9 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen kann es vorteilhaft sein, die Nukleinsäuresequenzen entsprechend der im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

10

Das DNA-Konstrukt, welches den L-Rhamnose-induzierbaren Promotor und die unter dessen Kontrolle zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz umfasst, gewährleistet aufgrund einer funktionellen Verknüpfung von besagtem Promotor und besagter Nukleinsäuresequenz

15

die Transkription und/oder Translation besagter Nukleinsäuresequenz.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man allgemein eine Anordnung in der eine genetische Kontrollsequenz ihre Funktion in

20

Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausüben kann.

Funktion kann dabei beispielsweise die Kontrolle der Expression d.h. Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz bedeuten. Kontrolle umfasst dabei beispielsweise die Initiierung, Steigerung, Steuerung oder Suppression der Expression d.h. Tran-

25

sription und ggf. Translation. Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoter, der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion

30

bei der Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einem der erfindungsgemässen DNA-Konstrukte zu gelangen. Die Herstellung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in T Maniatis, EF Fritsch

35

und J Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in TJ Silhavy, ML Berman und LW Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, FM et al., Current Protocols in Molecular

40

Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Besagtes DNA-Konstrukt kann weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff der Funktionselemente ist breit zu verstehen und

45

meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen, die Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemässen DNA-Konstrukte oder Organismen haben. Funktionselemente gewährleisten

## 19

sten, verstärken, regulieren oder modifizieren zum Beispiel die Transkription und gegebenenfalls Translation in entsprechenden Wirtsorganismen.

- 5 Funktionselemente sind beispielsweise beschrieben bei "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)" oder "Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108" sowie
- 10 den dort aufgewiesenen Zitaten. Je nach nachstehend näher beschriebenen Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus, der durch Einbringen der Expressionskassetten oder Vektoren in einen genetisch veränderten oder transgenen Organismus überführt wird, eignen sich verschiedene Kontrollsequenzen.

- 15 "Genetische Kontrollsequenzen" umfassen beispielsweise die 5'-untranslatierte Region oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. "Genetische Kontrollsequenzen" meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einer Signalpeptidsequenz
- 20 kodieren. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

a) Selektionsmarker

- 25 Selektionsmarker sind in der Regel erforderlich, um erfolgreich transformierte Zellen zu selektionieren und den Verlust des DNA-Konstruktes aus der Wirtszelle im Laufe der Zeit und der Zellteilungen zu verhindern. Ein solcher Verlust kann insbesondere dann auftreten, wenn das durch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz kodierte rekombinante Protein einen toxischen Effekt auf den prokaryontischen Organismus hat. Der
- 30 mit dem Expressionskonstrukt eingebrachte selektionierbaren Marker verleiht den erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum wie zum Beispiel Ampicillin, Kanamycin oder Hygromycin) verleiht. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

35

- Amp (Ampicillin-Resistenz; b-Lactamase)
- Cab (Carbenicillin-Resistenz)
- Cam (Chloramphenicol-Resistenz)
- Kan (Kanamycin-Resistenz)
- 40 - Rif (Rifampicin-Resistenz)
- Tet (Tetracyclin-Resistenz)
- Zeo (Zeocin-Resistenz)
- Spec (Spectinomycin)

45

Der Selektionsdruck wird durch entsprechende Mengen des Antibiotikums aufrechterhalten. Beispielhaft seien zu nennen: Ampicillin 100 mg/l, Carbenicillin 100 mg/l, Chloramphenicol.

35 mg/l, Kanamycin 30 mg/l, Rifampicin 200 mg/l, Tetracyclin 12,5 mg/l, Spectinomycin 50 mg/l.

Selektionsmarker umfassen ferner solche Gene und Genprodukte, die beispielsweise durch Komplementierung einer genetischen Defizienz in der Aminosäure- oder Nukleotidsynthese, eine Selektion einer entsprechend transformierten Wirtszelle ermöglichen. Dazu werden i.a. Medien eingesetzt, die besagte Aminosäure oder den besagten Nukleotidbaustein nicht enthalten. Verschiedene derartige Systeme sind dem Fachmann bekannt. Beispielfhaft seien die Defizienzen in der Tryptophan (z.B. trpC), Leucin (z.B. leuB), Histidin (z.B. hisB) Biosynthese zu nennen, wie sie z.B. im E.coli Stamm KC8 (Clontech) vorliegen. Diese Defizienzen können u.a. durch die selektionierbaren Marker TRP1, Leu2 und HIS3 komplementiert werden.

b) Transkriptionsterminatoren

Der Transkriptionsterminator vermindert eine ungewollte Transkription und erhöht die Plasmid- und mRNA Stabilität.

c) Shine-Dalgarno Sequenzen

Eine Shine-Dalgarno (SD) Sequenz ist erforderlich für die Initiation der Translation und ist komplementär zum 3'-Ende der 16S ribosomalen RNA. Die Effizienz der Initiation der Translation am Start-Kodon hängt von der tatsächlichen Sequenz ab. Eine geeignete Konsensussequenz für E.coli ist beispielhaft: 5'-TAAGGAGG-3'. Sie ist ca. 4 bis 14 Nukleotide stromaufwärts des Startkodons lokalisiert, wobei das Optimum bei 8 Nukleotiden liegt. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden (welche die Expression reduzieren können), sollte diese Region bevorzugt reich an A/T-Nukleotiden sein.

d) Startkodon

Das Startkodon ist der Initiationpunkt der Translation. In E. coli ist ATG das meist genutzte Startkodon; GTG kann alternativ auch genutzt werden.

e) "Tags" und Fusionsproteins

N- oder C-terminale Fusionen der zu exprimierenden rekombinanten Proteine mit kürzeren Peptiden ("Tags") oder anderen Proteinen (Fusionpartnern) können vorteilhaft sein. Sie können beispielsweise eine verbesserte Expression, Löslichkeit, Detektierbarkeit und Aufreinigung ermöglichen. Bevorzugt werden derartige Fusionen mit Protease-Spaltsequenzen (z.B. für Thrombin oder Faktor X) kombiniert, die eine Entfernung des



## 21

"Tags" bzw. des Fusionspartners nach der Expression und Aufreinigung ermöglichen.

- 5 f) Multiple Klonierungsregionen (Multiple cloning site; MCS) erlauben und erleichtern die Insertion einer oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.
- 10 g) Stop-Kodon / Translationsterminatoren.  
Von den drei möglichen Stopp-Kodons ist TAA bevorzugt, da es bei TAG und TGA unter Umständen zu einem "Durchlesen" ("Read-Through") ohne Abbruch der Translation kommen kann. Es können auch mehrere Stopp-Kodons infolge eingesetzt werden um eine verlässliche Termination zu gewährleisten.
- 15 h) Reportergene  
Reportergene kodieren für leicht quantifizierbare Proteine, die über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, der Expressionshöhe, des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Reportergene  
20 können z.B. für nachfolgende Proteine kodieren: Hydrolasen, Fluoreszenzproteine, Biolumineszproteine, Glucosidasen oder Peroxidasen. Bevorzugt sind Luciferasen,  $\beta$ -Galactosidasen,  $\beta$ -Glucuronidase, "Green Fluorescence Protein", Acetyl-, Phospho- oder Adenyltransferasen (siehe auch Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44).  
25

Im Falle von Selektionsmarkern oder Reporterproteinen ist die für besagte Proteine kodierende Nukleinsäuresequenz bevorzugt mit einem in dem entsprechenden prokaryontischen Wirtorganismus funktionellen Promotor und ggf. weiteren Kontrollsequenzen funktionell zu einer Expressionskassette verknüpft. Vorteilhafte Promotoren und Kontrollsequenzen sind dem Fachmann allgemein bekannt. Beispielsweise seien Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -PR- oder  
35  $\lambda$ -PL-Promotor zu nennen.

Die Herstellung einer transformierten Wirtszelle oder eines transformierten Wirtsorganismus erfordert, dass die entsprechende DNA (beispielsweise eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren) in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.  
40 Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA beispielsweise direkt durch Mikroinjektion, Elektroporation oder durch  
45 Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln (biolistische Verfahren mit der Genkanone "particle bombardment") eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethy-

- lenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Fusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Als bevorzugte allgemeine Methoden seien zu nennen Calciumphosphat vermittelte Transformation, DEAE-Dextran vermittelte Transformation, kationische Lipid-vermittelte Transformation, Elektroporation, Transduktion, Infektion. Derartige Verfahren sind dem Fachmann geläufig und beispielsweise beschrieben (Davis et al. (1986) Basic Methods In Molecular Biology; Sambrook J et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel FM et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons; Glover DM et al. (1995) DNA Cloning Vol.1, IRL Press ISBN 019-963476-9).

- Transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Verschiedene Selektionsmarker sind oben beschrieben.

- Das erfindungsgemäße Verfahren ist hinsichtlich der Art und Sequenz der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz bzw. des davon ausgehend exprimierten rekombinanten Proteins nicht eingeschränkt. Die unter Kontrolle der L-Rhamnose-induzierbaren Promotors zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können vielfältiger Art sein. Expression meint in diesem Zusammenhang Transkription und gegebenenfalls Translation. Neben der Expression von Nukleinsäuresequenzen, welche für rekombinante Proteine kodieren, können auch Nukleinsäuresequenzen exprimiert werden, die beispielsweise die Transkription einer antisense-RNA bedingen und so die Expression eines endogenen Gens der prokaryontischen Wirtszelle vermindern. Sowohl Sequenzen prokaryontischen als auch eukaryontischen Ursprungs können exprimiert werden. Bevorzugt werden Sequenzen exprimiert die für rekombinante Proteine kodieren, die in einem größerem Umfang herzustellen sind. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Enzyme, wie z.B. Chymosin, Proteasen, Polymerasen, Saccharidasen, Dehydrogenasen, Nukleasen, Glucanasen, Glucoseoxidase,  $\alpha$ -Amylase, Oxidoreduktasen (wie Peroxidasen oder Laccasen), Xylanasen, Phytasen, Cellulasen, Collagenasen, Hemicellulasen und Lipasen. Insbesondere bevorzugt sind

## 23

- Enzyme wie sie in Waschmitteln oder anderen Detergentien genutzt werden wie beispielsweise Meerrettichperoxidase, Proteasen, Amylasen, Lipasen, Esterasen oder Cellulasen
  - Enzyme wie sie in der Lebensmittelindustrie genutzt werden wie Proteasen, Lipasen, Lactasen,  $\beta$ -Glucanase, Cellulasen oder Pectinasen
  - Enzyme wie sie in industriellen Verfahren eingesetzt werden wie Lipasen,  $\alpha$ -Amylasen, Amiloglucosidasen, Glucoamylasen, Pullulanasen, Glucoseisomerasen,
  - Enzyme wie sie in industriellen Verfahren zur Herstellung von Chemikalien und Feinchemikalien eingesetzt werden wie Lipasen, Amidasen, Nitrilhydratasen, Esterasen oder Nitrilasen
  - Enzyme wie sie in der Tierernährung eingesetzt werden wie  $\beta$ -Glucanasen
  - Enzyme wie sie in der Papier- oder Lederindustrie eingesetzt werden wie Amylasen, Collagenasen, Cellulasen oder Xylanasen.
- 20 b) Säugerproteine wie beispielsweise Blutproteins (z.B. Serumalbumin, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Gewebefibrinogenfaktoren, Protein C, von Willebrand-Faktor, antithrombin 111 oder Erythropoietin), "Colony Stimulating Factors" (CFS) (z.B. "Granulocyte colony-stimulating factor" (G-CSF), "Macrophage colony-stimulating factor" (M-CSF) oder "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF)), Cytokine (z.B. Interleukine), Integrine, Adhäsionsmoleküle, Antikörper oder Antikörperfragmente, Strukturproteine (z.B. Collagen, Fibrin, Elastin, Tubulin, Actin oder Myosin), Wachstumsfaktoren, Zellzyklusproteine, Impfstoffe, Fibrinogen, Thrombin, Insulin.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform ist das rekombinante Protein eine Nitrilase, bevorzugt eine Nitrilase beschrieben durch eine Aminosäuresequenz, die kodiert wird durch eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Aminosäuresequenzen kodieren und mindestens 35 %

## 24

Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemässen Wirtszellen oder -organismen zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Feinchemikalien meint bevorzugt Proteine, Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe.

10

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen und anderen Feinchemikalien wie beispielsweise Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren (bevorzugt chiraler Carbonsäuren) unter Einsatz einer der erfindungsgemässen

15

prokaryontischen Wirtszellen oder einer Präparationen derselben. Die bevorzugten Proteine und Enzyme sind oben aufgeführt.

Dabei kann die prokaryontische Wirtszelle in einem wachsenden, ruhenden, immobilisierten oder aufgeschlossenen Zustand vorliegen. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z.B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemässe Verfahren vorteilhaft geeignet. Auch partiell gereinigte Enzympräparationen können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden können.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren, wobei ein racemisches Nitril (oder alternativ dessen Vorstufen Aldehyd und Blausäure/Cyanidsalz) zu besagter chiraler Carbonsäure umgesetzt wird durch Behandlung mit einer prokaryontische Wirtszelle, die zumindest defizient ist in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtszelle replizierbares DNA-Konstrukt enthält, welches eine für eine Nitrilase kodierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfaßt, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

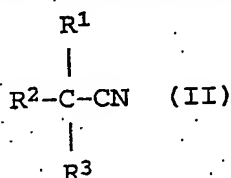
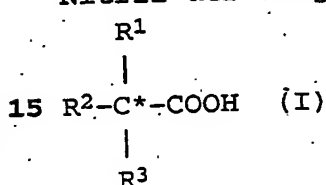
Die für die Nitrilase kodierende Nukleinsäuresequenz ist bevorzugt aus der Gruppe der oben angegebenen für Nitrilasen kodierenden Sequenzen ausgewählt.

45

## 25

Chirale Carbonsäuren sind gesuchte Verbindungen für die organische Synthesechemie. Sie sind Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen für den Pflanzenschutz. Chirale Carbonsäuren können zur klassischen Racematspaltung über Diastereomeresalze verwendet werden. So wird R-(-)- oder S-(-)-Mandelsäure beispielsweise zur Racematspaltung racemischer Amine eingesetzt. R-(-)-Mandelsäure wird ausserdem als Zwischenprodukt bei der Synthese genutzt.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel I ausgehend von einem racemischen Nitril der allgemeinen Formel II hergestellt.



\* ein optisch aktives Zentrum

20

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-, OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> und wobei die Reste R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> immer unterschiedlich sind,

25

R<sup>4</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, C1-C10-Alkylcarbonyl-, C2-C10-Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-,

30

R<sup>5</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-.

35

Als Nitril am meisten bevorzugt sind Mandelonitril, o-Chlormandelonitril, p-Chlormandelonitril oder m-Chlormandelonitril. Als chirale Carbonsäure sind am meisten bevorzugt R-Mandelsäure, S-Mandelsäure, R-p-Chlormandelsäure, S-p-Chlormandelsäure,

40 R-m-Chlormandelsäure, S-m-Chlormandelsäure, R-o-Chlormandelsäure oder S-o-Chlormandelsäure.

Einzelheiten zu der Durchführung dieser Umsetzungen bzw. zur Aufreinigung der Produkte etc. sind beispielsweise in WO 00/23577 im  
45 Detail beschrieben. Auf die dort als beschriebenen Edukte, Produkte und Verfahrensparameter wird ausdrücklich bezug genommen.

## Beispiele

Allgemeine Nukleinsäureverfahren wie z.B. Klonierung, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Mikroorganismen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wenn nichts anderes beschrieben wurde wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl Acad Sci USA 74:5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 1: Charakterisierung des E.coli-Stammes JB1204

Escherichia coli JB1204 (CGSC6999, Bulawa CE & Raetz CRH (1984) J Biol Chem 259:11257-11264) besitzt laut Literatur eine Transposoninsertion "rha-14::Tn10", wobei zur Sequenz oder Funktion von "rha-14" keine genaueren Angaben gemacht wurden. JB1204 (ein K12-Derivat) ist aufgrund zahlreicher anderer Mutationen im Wachstum Stämmen wie TG1 und W3110 unterlegen, weshalb er selbst nicht zur technischen Proteinherstellung herangezogen wird.

Um zu testen, ob der Stamm E.coli JB1204 noch Rhamnose verstoffwechselt und ob die Induktion eines Rhamnose-abhängigen Expressionssystems in E. coli JB1204 beeinträchtigt ist, wurden kompetente JB1204-Zellen hergestellt und mit dem Plasmid pDHE1650 transformiert, das ein pJOE-Derivat ist und unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors das Gen für eine Nitrilase trägt (Plasmid entspricht pDHE19.2 in DE 19848129). Nach 15 h Kultivierung bei 37 °C in LB-Ampicillin-Tetracyclin mit bzw. ohne Rhamnose wurde die optische Dichte der Kulturen gemessen und die Nitrilase-Aktivität nach Waschen der Zellen im "Resting-Cell"-Assay überprüft (siehe Tabelle 1). Bei Anzucht im Gegenwart von L-Rhamnose findet bei JB1204 wie auch beim Vergleichstamm TG1 eine Nitrilaseexpression statt, die ohne L-Rhamnose nicht erfolgt.

Tab. 1

Probe	Rhamnose-zusatz [g/L]	Rhamnose-verbrauch	OD <sub>600</sub>	Umsatz Mandelonitril
1	2	-	5,9	+
1	0	-	5,7	-
2	2	+	11,9	+
2	0	-	8,0	-

## 27

- 1, E.coli JB1204 pDHE1650 in LB Amp Tet;
- 2, E.coli TG1 pDHE1650 in LB Amp (Positivkontrolle)

Testbedingungen: 10 mM Tris-HCl, 6 mM Mandelonitril, 40°C  
5 Analyse: Probe mit 40 µl 1M HCl/ml abstoppen und  
nach Zellabtrennung mittels HPLC untersuchen  
wie in DE 19848129 beschrieben.

10 Beispiel 2: Herstellung des Rhamnose-defizienten Wirtsstammes  
TG10 zur Produktion rekombinanter Proteine

Der für die Herstellung rekombinanter Biokatalysatoren genutzte Stamm TG1 wurde durch P1-Transduktion so modifiziert, dass er Rhamnose nicht mehr verstoffwechselt, aber das auf Rhamnose-Induktion basierende Expressionssystem der pJOE- und pDHE-Vektoren noch unbeeinträchtigt funktioniert (Bezeichnung dieses neuen Stammabkömmlings: TG10).

20 Um Fermentationsverfahren kostengünstig und mit hohen Ausbeuten fahren zu können, ist die Auswahl des E.coli-Stammes wichtig. Daher wurde als Wirtsstamm E. coli TG1 gewählt, der für produktive Hochdichtezellfermentationen bekannt ist (Korz et al. (1995) J Biotechnol 39:59-65). Die Rhamnose-Defizienz aus JB1204 wurde durch P1-Transduktion und Selektion auf Tetracyclin (15 µg/ml) 25 auf TG1 pDHE1650 übertragen (=TG10 pDHE1650= Lu10569).

2.1 P1-Transduktionsprotokoll zum Transfer der Rhamnose-Defizienz von JB1204 (rha14::Tn10) auf TG1

30 a) Herstellung des Donor-Lysates

- Den Donor, also JB1204 in 3 ml LB-Tet (15 µg/ml) ca. 15 h bei 37°C anziehen (Vorkultur).
- 3 ml LB-Tet + 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 60 µl Vorkultur (=1:50) bis OD600= 0,3 - 0,5 bei 37°C inkubieren (ca. 45 min)
- 35 - + 100 µl (frisches) Lysat des Phagen P1, 10-120 min bis zur Zellyse gut weiterschütteln (Klärung, bei altem Lysat bis zu 5 h)
- + 60 µl Chloroform, 30 sec vortexen zur Abtötung restlicher Zellen, Lagerung bei 4°C.
- 40

b) Infektion des Rezipienten

- Den Rezipienten, also TG1 pDHE1650 (=Lu9682) in 3 ml LB-Amp ca. 15 h bei 37°C anziehen (Vorkultur)
- 45 - 5 ml LB-Amp + 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 100 µl Vorkultur (=1:50) bis OD600= 0,3 - 0,5 bei 37 °C inkubieren (ca. 30 min), Rest Vorkultur auf Eis

## 28

- Vorkultur und Hauaprkultur ernten, resuspendieren in 2,5 ml LB-Amp-Ca-Mg
- Je 2x 100 µl Rezipient mit 0, 5, 30, 100 µl Donor-Lysat versetzen sowie eine Kontrolle ohne Rezipient + 100 µl Donor-Lysat und 8 min bzw. 24 min ohne zu schütteln bei 30°C inkubieren (Infektion)
- + 100 µl 1 M Na-Citrat pH 7,0, 2 min bei 7000 rpm zentrifugieren, in 1 ml 0,1 M Citratpuffer pH 7,0 2-3x waschen und resuspendieren, 1 h 37°C ohne zu schütteln
- 10 - Ernte, resuspendieren in 100 µl 0,02 M Na-Citrat pH 7,0
- Je 80 µl ausplattieren auf LB-Amp-Tet sowie je 10 µl der Ansätze ohne Donorlysatz-Zugabe auf LB-Amp, Inkubation über Nacht bei 37°C
- Auf LB-Amp wird Rasen erhalten (Kontrolle). Kolonien von LB-Amp-Tet picken und Resistenzen, Rhamnose-Defizienz und -Induktionsfähigkeit, Aktivität verifizieren.

Parallel wurde auch TG1 pDHE1650 pAgro4 pHSG575, das Pendant zu TG1 pDHE1650 mit Chaperon-Coexpression (GroESL), transduziert

20 (+Spectinomycin 50 µg/ml und Chloramphenicol 10 µg/ml im Medium; Bezeichnung TG10 pDHE1650 pAgro4 pHSG575=Lu10571).

Nach Übernachtskultivierung der erhaltenen Klone in 3 ml LB-Ampicillin-Rhamnose (ca. 2 g/l)-Medium ( $\pm$  Tetracyclin 10 µg/ml) wurden

25 die optischen Dichten ( $\lambda=600$  nm) der Kulturen bestimmt. Die HPLC-Analytik der Kulturüberstände zeigte, daß der erhaltene E. coli-Stamm TG10 pDHE1650 Rhamnose nicht verstoffwechseln kann. Die Zellen wurden anschließend in Puffer gewaschen und im Resting-Cell-Assay auf ihre Nitrilaseaktivität getestet (Tabelle 2).

30 Die Rhamnose-defizienten Klone zeigten eine ähnliche Nitril-verseifende Aktivität wie der entsprechender Vergleichsstamm (TG1pDHE1650). Die Rhamnose-Konzentration nahm bei den Klonen kaum ab.

35

40

45



Tab. 2

	Probe	Rhamnose Rest [g/L]	Zell- konz. [xfach]	Inkub.- zeit [min.]	Säure [mM]	Aktivität (1x) [U/L]	OD <sub>600</sub>	Aktivität / OD <sub>600</sub> MW [U/L]
5	Blank	-	0	60	0,01	0		
	TG10 pDHE1650	1,71	0,01	60	1,02	1700	6,01	324
10			0,05	10	1,10	2200		
	TG1 pDHE1650	0	0,01	60	0,84	1400	7,90	180
15			0,05	10	0,72	1440		
	TG10 pDHE1650 pAgropHSG	1,67	0,01	60	0,78	1300	5,01	295
20			0,05	10	0,83	1660		
	TG1 pDHE1650 pAgropHSG	0,34	0,01	60	1,18	1967	7,51	297
25			0,05	10	1,25	2500		

Testbedingungen:

10 mM Tris-HCl, 6 mM Mandelonitril, 40°C

Analyse:

Probe mit 40 µl 1M HCl/ml abstoppen und nach  
Zellabtrennung mittels HPLC untersuchen wie  
in DE 19848129 beschrieben  
(1U = 1 µmol Mandelsäure/min)

Beispiel 3: "Curing" des Rhamnose-defizienten Wirtsstamm TG10  
pDHE1650

Die Durchführung der Transduktion mit E.coli TG1 pDHE1650 bot den  
Vorteil der Selektion gegen den Ursprungsstamm JB1204 mit Ampicillin.  
Für weitere Arbeiten wurde jedoch ein plasmidfreier  
Wirtsstamm benötigt, d.h. das Plasmid pDHE1650 sollte aus TG10  
pDHE1650 entfernt werden ("Curing" von TG10 pDHE1650). Dazu wurde  
E.coli TG10 pDHE1650 von Eis in 3 ml LB-Tet ohne Ampicillin angeimpft  
und ÜN bei 37 °C inkubiert. Daraus wurden eine 3 ml-Hauptkultur  
1:100 in LB-Tet animpft, die einem Hitzeschock unterzogen wurden  
(2,5 min 42°C). Nach 16 h Schütteln bei 37°C betrug die  
OD<sub>600</sub> der Kultur 1,3 (entspricht ca. 1,3x10<sup>9</sup> Zellen/ml). Je 100 µl  
der Verdünnungsstufen 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-7</sup> wurden ausplattiert auf LB-Tet

## 30

und die erhaltenen Kolonien (560+140+15+0) überstempelt auf LB-Tet mit Ampicillin. Ein dort schwach gewachsener Klon wurde nochmals auf LB-Amp-Tet ausgestrichen. Er wuchs nicht auf LB-Amp-Tet und zeigte nach Minipräparation (LB-Tet-Anzucht) auch keine Plasmid-DNA. Dieser Ampicillin-sensitive Klon wird als TG10 bezeichnet (=Lul0568) und dient als Ausgangsstamm für neue Überexpressionsstämme.

10 Beispiel 4: Herstellung von rekombinanter L-Pantolacton-Hydrolase mit dem Rhamnose-defizienten Wirtstamm E.coli TG10

15 Es wurden kompetente E. coli-TG10 Zellen hergestellt und mit dem Plasmid pDHE681, pAgro4 und pHSG575-transformiert (= Probe 1 in Tab.3). Nach Übernachtskultivierung bei 37 °C zeigten die Zellen eine hohe L-Pantolacton-verseifende Aktivität im Vergleich zum entsprechenden Kontrollstamm (TG1 pDHE681 pAgro4 pHSG575= Probe 2 in Tab.3), dessen maximale Aktivität i.d.R. nach 6-7 h Inkubation erreicht wird (ca. 1500 U/L) und durch längere Inkubation 20 stark abfällt. Die Rhamnose (0,5 g/L) wurde von TG10 pDHE681 pAgro4 pHSG575 nicht verstoffwechselt.

Tab. 3

25	Probe	Rhamnose Rest [g/L]	OD <sub>600</sub>	Zellkonz. [xfach]	Inkub.-zeit [h]	Säure [mM]	Aktivität (1x) [U/L]	Aktivität / OD <sub>600</sub> [U/L]
	Blank	-		0	1,0	1,74	-	
	1	0,52	6,35	0,2	1,0	29,9	2344,2	369,2
30	2	0	6,64	0,2	1,0	6,27	377,5	56,9

- 1, TG10 pDHE681 pAgro4 pHSG575; LB mit Ampicillin (Amp; 100 µg/ml) Tetracyclin (Tet 10 µg/ml), L-Rhamnose (Rha 0,5 g/l) und Isopropylthiogalactosid (IPTG 0,15 mM)
- 35 2, TG1 pDHE681 pAgro4 pHSG575; LB mit Ampicillin (Amp; 100 µg/ml), L-Rhamnose (Rha 0,5 g/l) und Isopropylthiogalactosid (IPTG 0,15 mM)

Der Test wurde detaillierter wiederholt. Die Zugabe von Tetracyclin (15 µg/ml) zum Medium ist zur Erhaltung der Rhamnose-Defizienz nicht notwendig.

## 31

**Beispiel 5: Bestimmung der Abhängigkeit der Induktion von der L-Rhamnose-Konzentration**

Der Stamm E.coli TG10 (pDHE1650, pAgro4, pHSG575) wurde analog zu  
5 Beispiel 1 auf LB Ampicillin (100 mg/l), Chloramphenicol 10 mg/l, Spectinomycin (50 mg/l), IPTG 0,15mM in Gegenwart verschiedener Rhamnosemengen (0 bis 2 g/l Rhamnose) angezogen und auf seine spezifische Nitrilaseaktivität hin untersucht (Doppelbestimmung). Bereits eine Konzentration von 0,01 g/l L-Rhamnose ergibt eine im  
10 Durchschnitt signifikante Induktion der Expression, während in Abwesenheit von Rhamnose keinerlei signifikante Expression (über die Enzymaktivität) ermittelt werden konnte.

Vgl. auch Fig.1:

15 A: Darstellung der relativen Aktivität (Rel. Act. %) im Verhältnis zu der L-Rhamnose-Konzentration (Conc. in g/l)

20 B: Darstellung der relativen spezifischen Aktivität (Rel. Spec Act. %) im Verhältnis zu der L-Rhamnose-Konzentration (Conc. in g/l)

Tab. 4:

	Rhamnosekonz.	OD600	Rel. Aktiv.	Rel. spez. Akt. [g/l]
25	0,00	5,4	0,1%	0,1%
	0,01	6,2	66%	65%
	0,02	5,8	70%	73%
	0,04	5,7	85%	92%
	0,05	5,2	83%	98%
30	0,07	5,9	90%	93%
	0,10	6,0	97%	98%
	0,15	5,6	101%	111%
	0,20	5,6	100%	108%
	0,30	5,3	99%	115%
35	0,40	5,7	107%	114%
	0,50	6,2	102%	100%
	1,00	5,8	101%	108%
	2,00	6,1	100%	100%
	0 + Tet	4,7	0%	0%
40	0,5 + Tet	5,1	81%	98%
	2,0 + Tet	4,5	86%	117%

## 32

**Beispiel 6: Analyse des Integrationsortes des Transposon im L-Rhamnose-Isomerase defizienten Stamm E.coli TG10**

Um den Integrationsort des Transposons Tn10 näher zu charakterisieren, wurden die Rhamnose-Gene rhaT, rhaB, rhaA und rhaD via PCR (Pfu-Polymerase) im Vergleich von TG1 (pDHE681) und TG10 (pDHE681) untersucht. Bei Amplifikation von rhaA (L-Rhamnose-Isomerase) oder der Region rhaA-rhaD mit den Primern MKe259/260 bzw. MKe 258/259 wurde bei dem mutagenisierten Stamm TG10 im Unterschied zum Wildtypstamm TG1 keine spezifisches Amplifikat erhalten.

MKe258 5'-CCCAAGCTTGGATCATGTTTGCTCCTTACAG (rhaD 3'Ende + HindIII)

MKe259 5'-GCGAATTCGCATGACCACTCAACTGGAACA (rhaA 5'Ende + EcoRI)

15 MKe260 5'-CCCAAGCTTACCCGCGGCGACTCAAATTT (rhaA 3'Ende + HindIII)

**Beispiel 7: Herstellung eines L-Rhamnose-Isomerase defizienten E.coli Stamms mittels gezieltem Knockout**

20 Zur Inaktivierung der L-Rhamnose-Isomerase (rhaA) wird das rhaA-Gen zunächst mit den Primern MKe001 und MKe002 amplifiziert und in pBluescriptSK<sup>+</sup> kloniert (XbaI/HindIII-Verdau und Ligation). Anschließend wird durch Restriktionsverdau mit BamHI und Auffüllreaktion mit Klenow-Fragment sowie anschließender Ligation ein  
25 Frameshift eingeführt und das entsprechende rha\*-Fragment in den Gene-Replacement-Vektor pKO3 (Link et al. (1997) J Bacteriol 179:6228-6237) umkloniert. Der Knock out des rhaA-Gens in TG1pDHE1650 durch homologe Rekombination mit dem rha\*-Konstrukt wird nach Link et al. ((Link et al. (1997) J Bacteriol  
30 179:6228-6237)) mittels Selektion auf Chloramphenicol bei 43°C, Replikaplattierung auf Saccharose bei 30°C und anschließender Verifizierung auf McConkey-Agar mit 1 g/L Rhamnose durchgeführt.

MKe001: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCATGACCACTCAACTGGAACA-3'

35 MKe002: 5'-CTAGCTCTAGATTACCCGCGGCGACTCAA-3'

**Beispiel 8: Herstellung von rekombinanter Nitrilase mit dem Rhamnose-defizienten Wirtsstamm TG10**

40 Die Fed-batch-Fermentation von TG10-Derivaten wie TG10 pDHE1650 pAgro4 pHSG575 erfolgt auf einem modifizierten Riesenberg-Medium mit Glycerin als C-Quelle und Rhamnose als Induktor zur Überexpression des Zielproteins, hier der Nitrilase. Mit dem Stamm wurden vergleichbare und höhere Zelldichten und Enzymaktivitäten erreicht.  
45

## 33

## 8.1 Fermentation von E. coli TG 1

Die Fermentation des *Escherichia coli* (TG1 pDHE1650 pAgro4 pHSG575) erfolgte im 20 L Bioreaktor. Der Reaktor mit 10L Arbeitsvolumen wurde mit 200 ml Vorkultur aus Schüttelkolben angeimpft. Das Vorkulturmedium entspricht dem Hauptkulturmedium.

## Medium:

40 g	Glycerin 99,5 %
10 15 g	Trypton
13,3 g	Kaliumdihydrogenphosphat
5 g	Hefeextrakt
4 g	Di-Ammoniumhydrogenphosphat
1,7 g	Citronensäure
15 1,1 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat
1 mL	Spurenelementlösung SL Korz 1000 C
0,1 mL	Tego KS 911 Antischaummittel
0.062 g	Eisen(II)sulfat Heptahydrat
10 mg	Thiaminhydrochlorid
20 ad 1 L.	VE-Wasser

Das Medium wird 30 min bei 121°C sterilisiert. Anschließend werden 0,1 g Ampicilin steril zugesetzt

## 25 Spurenelementlösung

Citronensäure*H <sub>2</sub> O	20 g
Kobalt(II)chlorid Hexachlorid (CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O)	2,5 g
Mangan(II)chlorid Tetrachlorid (MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O)	3,0 g
Kupfer(II)chlorid Dihydrat (CuCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	0,3 g

30 Borsäure (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)

Natriummolybdat Dihydrat (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Zinkacetat Dihydrat (Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	2,6 g
ad 1L VE- H <sub>2</sub> O	

## 35 Glycerinfeedlösung

2 L	VE-Wasser
211 g	Natriumsulfat
13,6 g	Eisen(II)sulfat Heptahydrat
8,8 kg	Glycerin 99,5 %
40 220 mL	Spurenelementlösung

## Rhamnosefeedlösung

703 g	VE-Wasser
297 g	Rhamnose Monohydrat

## 34

Die Fermentation erfolgt bei einer Temperatur von 37°C. Die Begasung wird zwischen 8-30 L/min, die Rührerdrehzahl von 400 bis 1500 1/min geregelt um einen pO<sub>2</sub> von 20 % nicht zu unterschreiten. Nach 1 h Fermentationszeit wird die Kultur mit IPTG (0,15 mM) induziert. Anschließend werden 76 ml Rhamnosefeedlösung zugesetzt. Bei einem Unterschreiten der Rhamnosekonzentration im Fermenter von 1.0 g/L wird Rhamnosefeedlösung nachdosiert. Nach Verbrauch der vorgelegten Glycerinmenge wird kontinuierlich Glycerin zugefüttert.

10

## Ergebnisse:

Zeit	pO <sub>2</sub>	BTM	Rhamnose	dosierte Rhamnose- feedlösung	Glycerin
[h]	[%]	[g/L]	[g/L]	[g]	[g/L]
0	0	0	0	0	40.0
2	75.8	2.3	1.70	76	35.9
5	20.5	7.5	1.54	115	33.6
8	33.7	17.3	1.96	244	25.4
11	39.3	15.7	3.11	365	17.0
14	22.6	18.8	2.71	364	8.6
17	30.1	21.4	1.87	404	0
20	35.1	24.8	1.36	474	0
23	21.5	31.8	1.18	673	0
26	23.9	28.7	1.80	970	0
29	36.4	42.2	0.48	1234	0
32	28.5	38.7	1.20	1639	0
35	29.8	47.0	1.22	2033	0
38	44.3	49.2	1.19	2474	0
41	47.6	45.4	1.45	2879	0
44	46.2	45.2	1.80	3237	0
Aktivität nach 44h: 57200 U/L					

30

## 8.2 Fermentation von E. coli TG 10

Die Fermentation des *Escherichia coli* TG10 (pDHE1650 pAgro4 pHSG575) erfolgte nach derselben Vorschrift wie in Beispiel 1 mit dem Unterschied, dass die Induktion mit 18,5 g Rhamnosefeedlösung vorgenommen wurde. Es wurde keine Nachdosierung der Rhamnose vorgenommen.

40

45

## 35

## Ergebnisse:

	Zeit	pO <sub>2</sub>	BTM	Rhamnose	dosierte Rhamnose- feedlösung	Glycerin
	[h]	[%]	[g/L]	[g/L]	[g]	[g/L]
5	0	0	0	0.00	0	40.0
	2	71.4	2.7	0.58	18.5	38.6
	5	20.7	7.0	0.59	18.5	36.5
	8	21.7	13.2	0.59	18.5	26.4
	11	31.1	16.9	0.57	18.5	13.2
10	14	44.6	19.0	0.60	18.5	0
	17	50.5	24.0	0.58	18.5	0
	20	35.9	26.1	0.57	18.5	0
	23	33.9	33.4	0.58	18.5	0
	26	40.4	36.0	0.57	18.5	0
	29	38.2	40.8	0.55	18.5	0
15	32	34.3	45.3	0.58	18.5	0
	35	45.7	48.7	0.50	18.5	0
	38	40.0	50.7	0.50	18.5	0
	41	31.8	52.5	0.44	18.5	0
	44	29.5	50.0	0.44	18.5	0
20	Aktivität nach 44h: 59200 U/L					

## 8.3 Aktivitätstest:

Zu 880 µl Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (10mM) werden 50 µl Zell-  
suspension pipettiert und auf 30°C temperiert. Die Reaktion wird  
durch Zugabe von 20 µl methanolischer Mandelonitrillösung (12%)  
gestartet. Nach 10min wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 50  
µl 1M HC gestoppt. Die Zellmasse wird abzentrifugiert und die  
Mandelsäurekonzentration im Überstand wird per HPLC (ODS Hypersil  
100\*2,0 mm, Laufmittel: 75% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (14.8mM) / 25% Methanol; Fluß-  
rate: 0.5 ml/min; Injektionsvolumen: 2 µl; Säulentemperatur: 40°C;  
Detektion: 210nm; Retentionszeit Mandelsäure: 0.9 min) gemessen.

## 8.4 Bestimmung der Rhamnosekonzentration:

Zur online Probenahme am Fermenter bedient man sich eines Kera-  
mikfilters und einer kontinuierlich betriebenen Schlauchpumpe.  
Die Programmierung der HPLC-Anlage erfolgt so, daß nach jeder ab-  
geschlossenen Analyse eine erneute Einspritzung erfolgt. Dazwi-  
schen wird das Filtrat aus dem Fermenter in ein Abfallgefäß ge-  
pumpt.

## Chromatographische Bedingungen:

Säule: HPX 87 H, 7,8 x 300 mm  
Eluent: 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Flußrate: 0,5 mL/min  
Injektionsvolumen: 1 µL  
Säulentemperatur: 55°C  
Detektion: RI

## L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme

## Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose induziert, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase.

20

25

30

35

40

45



1

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft  
<120> L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme  
<130> AE20020689  
<140>  
<141>  
<160> 19  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 2046  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (288)..(1121)  
<223> coding for rhaS (positive regulator of rhaBAD operon)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1108)..(2043)  
<223> coding for rhaR (positive regulator of rhaRS operon)  
<220>  
<221> protein\_bind  
<222> (56)..(72)  
<223> potential RhaS binding site  
<220>  
<221> protein\_bind  
<222> (89)..(105)  
<223> potential RhaS binding site  
<220>  
<221> protein\_bind  
<222> (172)..(203)  
<223> potential RhaR binding site  
<220>  
<221> protein\_bind  
<222> (210)..(241)  
<223> potential RhaR binding site  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (24)  
<223> potential start of transcription (complement)  
<400> 1  
aatgtgatcc tgctgaattt cattacgacc agtctaaaaa ggcgctgaat tcgcgacctt 60  
ctcgttactg acaggaaaat gggccattgg caaccaggga aagatgaacg tgatgatgtt 120  
cacaatttgg tgaattgtgg tgatgtgatg ctcaccgcat ttcctgaaaa ttcacgctgt 180  
atcttgaaaa atcgacgttt tttacgtggt tttccgtcga aaatttaagg taagaacctg 240  
acctcgtgat tactatttcg ccgtgttgac gacatcagga ggccagtatg accgtattac 300  
atagtgtgga tttttttccg tctggtaacg cgtccgtggc gatagaaccc cggctcccgc 360  
aggcggattt tcctgaacat catcatgatt ttcatgaaat tgtgattgtc gaacatggca 420  
cgggtattca tgtgtttaat gggcagccct ataccatcac cgggtggcacg gtctgtttcg 480

2

```

tacgcgatca tgatcggcat ctgtatgaac ataccgataa tctgtgtctg accaatgtgc 540
tgtatcgctc gccggatcga tttcagtttc tcgccgggct gaatcagttg ctgccacaag 600
agctggatgg gcagtatccg tctcactggc gcgttaacca cagcgtattg cagcaggtgc 660
gacagctggt tgcacagatg gaacagcagg aaggggaaaa tgatttaccg tcgaccgcca 720
gtcgcgagat cttgtttatg caattactgc tcttgctgcg taaaagcagt ttgcaggaga 780
acctggaaaa cagcgcgatca cgtctcaact tgcttctggc ctggctggag gaccattttg 840
ccgatgaggt gaattgggat gccgtggcgg atcaattttc tctttcactg cgtacgctac 900
atcggcagct taagcagcaa acgggactga cgcctcagcg atacctgaac cgcctgcgac 960
tgatgaaagc ccgacatctg ctacgccaca gcgaggccag cgttactgac atcgccatc 1020
gctgtggatt cagcgacagt aaccactttt cgacgctttt tcgccgagag ttaactggt 1080
caccgcgtga tattcgccag ggacgggatg gctttctgca ataacgcgaa tcttctcaac 1140
gtatttgtac gccatattgc gaataatcaa cttcgttctc tggccgaggt agccacggtg 1200
gcgcacagct taaaacttct caaagatgat ttttttgcca gcgaccagca ggcagtcgct 1260
gtggctgacc gttatccgca agatgtcttc gctgaacata cacatgattt ttgtgagctg 1320
gtgattgtct ggccgggtaa tggcctgcat gtactcaacg atcgccctta tcgcattacc 1380
cgtggcgatc tcttttacat tcatgctgac gataaacact cctacgcttc cgttaacgat 1440
ctggttttgc agaattattt ttattggccg gagcgtctga agctgaatct tgactggcag 1500
ggggcgattc cgggatttaa cgccagcgca gggcaaccac actggcgctt aggtagcatg 1560
gggatggcgc aggcgcggca gggtatcggt cagcttgagc atgaaagtag tcagcatgtg 1620
ccgtttgcta acgaaatggc tgagttgctg ttcgggcagt tgggtgatgt gctgaatcgc 1680
catcgttaca ccagtgatcc gttgccgcca acatccagcg aaacgttgct ggataagctg 1740
attaccgggc tggcggctag cctgaaaagt ccctttgcgc tggataaatt ttgtgatgag 1800
gcatcgtgca gtgagcgcgt tttgcgtcag caatttcgcc agcagactgg aatgaccatc 1860
aatcaatata tgcgacaggt cagagtgtgt catgcgcaat atcttctcca gcatagccgc 1920
ctgttaatca gtgatatttc gaccgaatgt ggctttgaag atagtaacta tttttcgggtg 1980
gtgtttaccg gggaaaccgg gatgacgccc agccagtggc gtcactctca ttcgcagaaa 2040
gattaa 2046

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 287

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(287)

&lt;223&gt; rhaBAD promoter fragment containing rhaS and rhaR binding sites

&lt;400&gt; 2

```

actggcctcc tgatgtcgtc aacacggcga aatagtaatc acgaggtcag gttcttacct 60
taaattttcg acggaaaacc acgtaaaaaa cgtcgatttt tcaagataca gcgtgaattt 120
tcaggaaatg cggtgagcat cacatcacca caattcagca aattgtgaac atcatcacgt 180
tcatctttcc ctggttgcca atggcccatt ttctgtcag taacgagaag gtcgcgaatt 240
caggcgcttt ttagactggt cgtaatgaaa ttcagcagga tcacatt 287

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(125)

&lt;223&gt; rhaBAD promoter fragment containing RhaS binding site

&lt;400&gt; 3

```

ttgtgaacat catcacgttc atctttccct ggttgccaat ggcccatttt cctgtcagta 60
acgagaaggt cgcgaaattca ggcgcttttt agactggtcg taatgaaatt cagcaggatc 120
acatt 125

```

<210> 4  
 <211> 123  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(123)  
 <223> rhaBAD promoter fragment containing RhaS binding site  
 <400> 4  
 atcaccacaa ttcagcaa atcgtgaacatc atcacgttca tctttccctg gttgccaatg 60  
 gccattttc ctgtcagtaa cgagaaggtc gcgaattcag gcgcttttta gactggtcgt 120  
 aat 123  
 <210> 5  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(51)  
 <223> palindromic RhaS binding site of rhaBAD promoter  
 <400> 5  
 atctttccct gggtgccaat ggccatttt cctgtcagta acgagaaggc c 51  
 <210> 6  
 <211> 1071  
 <212> DNA  
 <213> Alcaligenes faecalis  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1068)  
 <223> coding for nitrilase  
 <400> 6  
 atg cag aca aga aaa atc gtc cgg gca gcc gcc gta cag gcc gcc tct 48  
 Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser  
 1 5 10 15  
 ccc aac tac gat ctg gca acg ggt gtt gat aaa acc att gag ctg gct 96  
 Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala  
 20 25 30  
 cgt cag gcc cgc gat gag ggc tgt gac ctg atc gtg ttt ggt gaa acc 144  
 Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr  
 35 40 45  
 tgg ctg ccc gga tat ccc ttc cac gtc tgg ctg ggc gca ccg gcc tgg 192  
 Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp  
 50 55 60  
 tcg ctg aaa tac agt gcc cgc tac tat gcc aac tcg ctc tcg ctg gac 240  
 Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp  
 65 70 75 80  
 agt gca gag ttt caa cgc att gcc cag gcc gca cgg acc ttg ggt att 288  
 Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile  
 85 90 95  
 ttc atc gca ctg ggt tat agc gag cgc agc ggc ggc agc ctt tac ctg 336  
 Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu  
 100 105 110

ggc caa tgc ctg atc gac gac aag ggc gag atg ctg tgg tcg cgt cgc	384
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg	
115 120 125	
aaa ctc aaa ccc acg cat gta gag cgc acc gta ttt ggt gaa ggt tat	432
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr	
130 135 140	
gcc cgt gat ctg att gtg tcc gac aca gaa ctg gga cgc gtc ggt gct	480
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala	
145 150 155 160	
cta tgc tgc tgg gag cat ttg tcg ccc ttg agc aag tac gcg ctg tac	528
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr	
165 170 175	
tcc cag cat gaa gcc att cac att gct gcc tgg ccg tcg ttt tcg cta	576
Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu	
180 185 190	
tac agc gaa cag gcc cac gcc ctc agt gcc aag gtg aac atg gct gcc	624
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala	
195 200 205	
tcg caa atc tat tcg gtt gaa ggc cag tgc ttt acc atc gcc gcc agc	672
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser	
210 215 220	
agt gtg gtc acc caa gag acg cta gac atg ctg gaa gtg ggt gaa cac	720
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His	
225 230 235 240	
aac gcc ccc ttg ctg aaa gtg ggc ggc ggc agt tcc atg att ttt gcg	768
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala	
245 250 255	
ccg gac gga cgc aca ctg gct ccc tac ctg cct cac gat gcc gag ggc	816
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly	
260 265 270	
ttg atc att gcc gat ctg aat atg gag gag att gcc ttc gcc aaa gcg	864
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala	
275 280 285	
atc aat gac ccc gta ggc cac tat tcc aaa ccc gag gcc acc cgt ctg	912
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu	
290 295 300	
gtg ctg gac ttg ggg cac cga gac ccc atg act cgg gtg cac tcc aaa	960
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys	
305 310 315 320	
agc gtg acc agg gaa gag gct ccc gag caa ggt gtg caa agc aag att	1008
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile	
325 330 335	
gcc tca gtc gct atc agc cat cca cag gac tcg gac aca ctg cta gtg	1056
Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val	
340 345 350	
caa gag ccg tct tga	1071
Gln Glu Pro Ser	
355	

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 356

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Alcaligenes faecalis

&lt;400&gt; 7

Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala  
 20 25 30

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr  
 35 40 45

Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp  
 50 55 60

Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp  
 65 70 75 80

Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile  
 85 90 95

Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu  
 100 105 110

Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg  
 115 120 125

Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr  
 130 135 140

Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr  
 165 170 175

Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu  
 180 185 190

Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala  
 195 200 205

Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser  
 210 215 220

Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His  
 225 230 235 240

Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala  
 245 250 255

Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly  
 260 265 270

Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala  
 275 280 285

Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu  
 290 295 300

Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys  
 305 310 315 320

Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile  
 325 330 335

Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val  
 340 345 350

Gln Glu Pro Ser  
355

<210> 8

<211> 1260

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1257)

<223> coding for rhaA (L-rhamnose isomerase)

<400> 8

atg	acc	act	caa	ctg	gaa	cag	gcc	tgg	gag	cta	gcg	aaa	cag	cgt	ttc	48
Met	Thr	Thr	Gln	Leu	Glu	Gln	Ala	Trp	Glu	Leu	Ala	Lys	Gln	Arg	Phe	
1				5				10						15		

gcg	gcg	gtg	ggg	att	gat	gtc	gag	gag	gcg	ctg	cgc	caa	ctt	gat	cgt	96
Ala	Ala	Val	Gly	Ile	Asp	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Asp	Arg	
		20					25						30			

tta	ccc	gtt	tca	atg	cac	tgc	tgg	cag	ggc	gat	gat	gtt	tcc	ggg	ttt	144
Leu	Pro	Val	Ser	Met	His	Cys	Trp	Gln	Gly	Asp	Asp	Val	Ser	Gly	Phe	
		35					40					45				

gaa	aac	ccg	gaa	ggg	tcg	ctg	acc	ggg	ggg	att	cag	gcc	aca	ggc	aat	192
Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Ile	Gln	Ala	Thr	Gly	Asn	
	50					55					60					

tat	ccg	ggc	aaa	gcg	cgt	aat	gcc	agt	gag	cta	cgt	gcc	gat	ctg	gaa	240
Tyr	Pro	Gly	Lys	Ala	Arg	Asn	Ala	Ser	Glu	Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Glu	
	65				70				75					80		

cag	gct	atg	cgg	ctg	att	ccg	ggg	ccg	aaa	cgg	ctt	aat	tta	cat	gcc	288
Gln	Ala	Met	Arg	Leu	Ile	Pro	Gly	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Leu	His	Ala	
			85					90						95		

atc	tat	ctg	gaa	tca	gat	acg	cca	gtc	tcg	cgc	gac	cag	atc	aaa	cca	336
Ile	Tyr	Leu	Glu	Ser	Asp	Thr	Pro	Val	Ser	Arg	Asp	Gln	Ile	Lys	Pro	
		100					105					110				

gag	cac	ttc	aaa	aac	tgg	gtt	gaa	tgg	gcg	aaa	gcc	aat	cag	ctc	ggg	384
Glu	His	Phe	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Trp	Ala	Lys	Ala	Asn	Gln	Leu	Gly	
	115					120					125					

ctg	gat	ttt	aac	ccc	tcc	tgc	ttt	tcg	cat	ccg	cta	agc	gcc	gat	ggc	432
Leu	Asp	Phe	Asn	Pro	Ser	Cys	Phe	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Ala	Asp	Gly	
	130					135					140					

ttt	acg	ctt	tcc	cat	gcc	gac	gac	agc	att	cgc	cag	ttc	tgg	att	gat	480
Phe	Thr	Leu	Ser	His	Ala	Asp	Asp	Ser	Ile	Arg	Gln	Phe	Trp	Ile	Asp	
	145				150					155				160		

cac	tgc	aaa	gcc	agc	cgt	cgc	gtt	tcg	gcc	tat	ttt	ggc	gag	caa	ctc	528
His	Cys	Lys	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Ser	Ala	Tyr	Phe	Gly	Glu	Gln	Leu	
			165				170					175				

ggc	aca	cca	tcg	gtg	atg	aac	atc	tgg	atc	ccg	gat	ggg	atg	aaa	gat	576
Gly	Thr	Pro	Ser	Val	Met	Asn	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Met	Lys	Asp	
		180					185					190				

atc	acc	gtt	gac	cgt	ctc	gcc	ccg	cgt	cag	cgt	ctg	ctg	gca	gca	ctg	624
Ile	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Ala	Pro	Arg	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	
		195				200					205					

7

gat gag gtg atc agc gag aag cta aac cct gcg cac cat atc gac gcc	672
Asp Glu Val Ile Ser Glu Lys Leu Asn Pro Ala His His Ile Asp Ala	
210 215 220	
gtt gag agc aaa ttg ttt ggc att ggc gca gag agc tac acg gtt ggc	720
Val Glu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Gly Ala Glu Ser Tyr Thr Val Gly	
225 230 235 240	
tcc aat gag ttt tac atg ggg tat gcc acc agc cgc cag act gcg ctg	768
Ser Asn Glu Phe Tyr Met Gly Tyr Ala Thr Ser Arg Gln Thr Ala Leu	
245 250 255	
tgc ctg gac gcc ggg cac ttc cac ccg act gaa gtg att tcc gac aag	816
Cys Leu Asp Ala Gly His Phe His Pro Thr Glu Val Ile Ser Asp Lys	
260 265 270	
att tcc gcc gcc atg ctg tat gtg ccg cag ttg ctg ctg cac gtc agc	864
Ile Ser Ala Ala Met Leu Tyr Val Pro Gln Leu Leu Leu His Val Ser	
275 280 285	
cgt ccg gtt cgc tgg gac agc gat cac gta gtg ctg ctg gat gat gaa	912
Arg Pro Val Arg Trp Asp Ser Asp His Val Val Leu Leu Asp Asp Glu	
290 295 300	
acc cag gca att gcc agt gag att gtg cgt cac gat ctg ttt gac cgg	960
Thr Gln Ala Ile Ala Ser Glu Ile Val Arg His Asp Leu Phe Asp Arg	
305 310 315 320	
gtg cat atc ggc ctt gac ttc ttc gat gcc tct atc aac cgc att gcc	1008
Val His Ile Gly Leu Asp Phe Phe Asp Ala Ser Ile Asn Arg Ile Ala	
325 330 335	
gcg tgg gtc att ggt aca cgc aat atg aaa aaa gcc ctg ctg cgt gcg	1056
Ala Trp Val Ile Gly Thr Arg Asn Met Lys Lys Ala Leu Leu Arg Ala	
340 345 350	
ttg ctg gaa cct acc gct gac gtg cgc aag ctg gaa gcg gcg ggc gat	1104
Leu Leu Glu Pro Thr Ala Asp Val Arg Lys Leu Glu Ala Ala Gly Asp	
355 360 365	
tac act gcg cgt ctg gca ctg ctg gaa gag cag aaa tcg ttg ccg tgg	1152
Tyr Thr Ala Arg Leu Ala Leu Leu Glu Glu Gln Lys Ser Leu Pro Trp	
370 375 380	
cag gcg gtc tgg gaa atg tat tgc caa cgt cac gat acg cca gca ggt	1200
Gln Ala Val Trp Glu Met Tyr Cys Gln Arg His Asp Thr Pro Ala Gly	
385 390 395 400	
agc gaa tgg ctg gag agc gtg cgg gct tat gag aaa gaa att ttg agt	1248
Ser Glu Trp Leu Glu Ser Val Arg Ala Tyr Glu Lys Glu Ile Leu Ser	
405 410 415	
cgc cgc ggg taa	1260
Arg Arg Gly	
<210> 9	
<211> 419	
<212> PRT	
<213> Escherichia coli	
<400> 9	
Met Thr Thr Gln Leu Glu Gln Ala Trp Glu Leu Ala Lys Gln Arg Phe	
1 5 10 15	
Ala Ala Val Gly Ile Asp Val Glu Glu Ala Leu Arg Gln Leu Asp Arg	
20 25 30	

Leu Pro Val Ser Met His Cys Trp Gln Gly Asp Asp Val Ser Gly Phe  
 35 40 45  
 Glu Asn Pro Glu Gly Ser Leu Thr Gly Gly Ile Gln Ala Thr Gly Asn  
 50 55 60  
 Tyr Pro Gly Lys Ala Arg Asn Ala Ser Glu Leu Arg Ala Asp Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Met Arg Leu Ile Pro Gly Pro Lys Arg Leu Asn Leu His Ala  
 85 90 95  
 Ile Tyr Leu Glu Ser Asp Thr Pro Val Ser Arg Asp Gln Ile Lys Pro  
 100 105 110  
 Glu His Phe Lys Asn Trp Val Glu Trp Ala Lys Ala Asn Gln Leu Gly  
 115 120 125  
 Leu Asp Phe Asn Pro Ser Cys Phe Ser His Pro Leu Ser Ala Asp Gly  
 130 135 140  
 Phe Thr Leu Ser His Ala Asp Asp Ser Ile Arg Gln Phe Trp Ile Asp  
 145 150 155 160  
 His Cys Lys Ala Ser Arg Arg Val Ser Ala Tyr Phe Gly Glu Gln Leu  
 165 170 175  
 Gly Thr Pro Ser Val Met Asn Ile Trp Ile Pro Asp Gly Met Lys Asp  
 180 185 190  
 Ile Thr Val Asp Arg Leu Ala Pro Arg Gln Arg Leu Leu Ala Ala Leu  
 195 200 205  
 Asp Glu Val Ile Ser Glu Lys Leu Asn Pro Ala His His Ile Asp Ala  
 210 215 220  
 Val Glu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Gly Ala Glu Ser Tyr Thr Val Gly  
 225 230 235 240  
 Ser Asn Glu Phe Tyr Met Gly Tyr Ala Thr Ser Arg Gln Thr Ala Leu  
 245 250 255  
 Cys Leu Asp Ala Gly His Phe His Pro Thr Glu Val Ile Ser Asp Lys  
 260 265 270  
 Ile Ser Ala Ala Met Leu Tyr Val Pro Gln Leu Leu Leu His Val Ser  
 275 280 285  
 Arg Pro Val Arg Trp Asp Ser Asp His Val Val Leu Leu Asp Asp Glu  
 290 295 300  
 Thr Gln Ala Ile Ala Ser Glu Ile Val Arg His Asp Leu Phe Asp Arg  
 305 310 315 320  
 Val His Ile Gly Leu Asp Phe Phe Asp Ala Ser Ile Asn Arg Ile Ala  
 325 330 335  
 Ala Trp Val Ile Gly Thr Arg Asn Met Lys Lys Ala Leu Leu Arg Ala  
 340 345 350  
 Leu Leu Glu Pro Thr Ala Asp Val Arg Lys Leu Glu Ala Ala Gly Asp  
 355 360 365  
 Tyr Thr Ala Arg Leu Ala Leu Leu Glu Glu Gln Lys Ser Leu Pro Trp  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Trp Glu Met Tyr Cys Gln Arg His Asp Thr Pro Ala Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Glu Trp Leu Glu Ser Val Arg Ala Tyr Glu Lys Glu Ile Leu Ser  
 405 410 415



Arg Arg Gly

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1467)

&lt;223&gt; coding for rhaB (rhammolukinase)

&lt;400&gt; 10

atg acc ttt cgc aat tgt gtc gcc gtc gat ctc ggc gca tcc agt ggg	48
Met Thr Phe Arg Asn Cys Val Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Ser Gly	
1 5 10 15	
cgc gtg atg ctg gcg cgt tac gag cgt gaa tgc cgc agc ctg acg ctg	96
Arg Val Met Leu Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Cys Arg Ser Leu Thr Leu	
20 25 30	
cgc gaa atc cat cgt ttt aac aat ggg ctg cat agt cag aac ggc tat	144
Arg Glu Ile His Arg Phe Asn Asn Gly Leu His Ser Gln Asn Gly Tyr	
35 40 45	
gtc acc tgg gat gtg gat agc ctt gaa agt gcc att cgc ctt gga tta	192
Val Thr Trp Asp Val Asp Ser Leu Glu Ser Ala Ile Arg Leu Gly Leu	
50 55 60	
aac aag gtg tgc gag gaa ggg att cgt atc gat agc att ggg att gat	240
Asn Lys Val Cys Glu Glu Gly Ile Arg Ile Asp Ser Ile Gly Ile Asp	
65 70 75 80	
acc tgg ggc gtg gac ttt gtg ctg ctc gac caa cag ggt cag cgt gtg	288
Thr Trp Gly Val Asp Phe Val Leu Leu Asp Gln Gln Gly Gln Arg Val	
85 90 95	
ggc ctg ccc gtt gct tat cgc gat agc cgc acc aat ggc cta atg gcg	336
Gly Leu Pro Val Ala Tyr Arg Asp Ser Arg Thr Asn Gly Leu Met Ala	
100 105 110	
cag gca caa caa caa ctc ggc aaa cgc gat att tat caa cgt agc ggc	384
Gln Ala Gln Gln Gln Leu Gly Lys Arg Asp Ile Tyr Gln Arg Ser Gly	
115 120 125	
atc cag ttt ctg ccc ttc aat acg ctt tat cag ttg cgt gcg ctg acg	432
Ile Gln Phe Leu Pro Phe Asn Thr Leu Tyr Gln Leu Arg Ala Leu Thr	
130 135 140	
gag caa caa cct gaa ctt att cca cac att gct cac gct ctg ctg atg	480
Glu Gln Gln Pro Glu Leu Ile Pro His Ile Ala His Ala Leu Leu Met	
145 150 155 160	
ccg gat tac ttc agt tat cgc ctg acc ggc aag atg aac tgg gaa tat	528
Pro Asp Tyr Phe Ser Tyr Arg Leu Thr Gly Lys Met Asn Trp Glu Tyr	
165 170 175	
acc aac gcc acg acc acg caa ctg gtc aat atc aat agc gac gac tgg	576
Thr Asn Ala Thr Thr Thr Gln Leu Val Asn Ile Asn Ser Asp Asp Trp	
180 185 190	
gac gag tcg cta ctg gcg tgg agc ggg gcc aac aaa gcc tgg ttt ggt	624
Asp Glu Ser Leu Leu Ala Trp Ser Gly Ala Asn Lys Ala Trp Phe Gly	
195 200 205	

10

cgc ccg acg cat ccg ggt aat gtc ata ggt cac tgg att tgc ccg cag	672
Arg Pro Thr His Pro Gly Asn Val Ile Gly His Trp Ile Cys Pro Gln	
210 215 220	
ggt aat gag att cca gtg gtc gcc gtt gcc agc cat gat acc gcc agc	720
Gly Asn Glu Ile Pro Val Val Ala Val Ala Ser His Asp Thr Ala Ser	
225 230 235 240	
gcg gtt atc gcc tgc ccg tta aac ggc tca cgt gct gct tat ctc tct	768
Ala Val Ile Ala Ser Pro Leu Asn Gly Ser Arg Ala Ala Tyr Leu Ser	
245 250 255	
tct ggc acc tgg tca ttg atg ggc ttc gaa agc cag acg cca ttt acc	816
Ser Gly Thr Trp Ser Leu Met Gly Phe Glu Ser Gln Thr Pro Phe Thr	
260 265 270	
aat gac acg gca ctg gca gcc aac atc acc aat gaa ggc ggg gcg gaa	864
Asn Asp Thr Ala Leu Ala Ala Asn Ile Thr Asn Glu Gly Gly Ala Glu	
275 280 285	
ggt cgc tat cgg gtg ctg aaa aat att atg ggc tta tgg ctg ctt cag	912
Gly Arg Tyr Arg Val Leu Lys Asn Ile Met Gly Leu Trp Leu Leu Gln	
290 295 300	
cga gtg ctt cag gag cag caa atc aac gat ctt ccg gcg ctt atc tcc	960
Arg Val Leu Gln Glu Gln Ile Asn Asp Leu Pro Ala Leu Ile Ser	
305 310 315 320	
gcg aca cag gca ctt ccg gct tgc cgc ttc att atc aat ccc aat gac	1008
Ala Thr Gln Ala Leu Pro Ala Cys Arg Phe Ile Ile Asn Pro Asn Asp	
325 330 335	
gat cgc ttt att aat cct gag acg atg tgc agc gaa att cag gct gcg	1056
Asp Arg Phe Ile Asn Pro Glu Thr Met Cys Ser Glu Ile Gln Ala Ala	
340 345 350	
tgt cgg gaa acg gcg caa ccg atc ccg gaa agt gat gct gaa ctg gcg	1104
Cys Arg Glu Thr Ala Gln Pro Ile Pro Glu Ser Asp Ala Glu Leu Ala	
355 360 365	
cgc tgc att ttc gac agt ctg gcg ctg ctg tat gcc gat gtg ttg cat	1152
Arg Cys Ile Phe Asp Ser Leu Ala Leu Leu Tyr Ala Asp Val Leu His	
370 375 380	
gag ctg gcg cag ctg cgc ggt gaa gat ttc tgc caa ctg cat att gtc	1200
Glu Leu Ala Gln Leu Arg Gly Glu Asp Phe Ser Gln Leu His Ile Val	
385 390 395 400	
ggc gga ggc tgc cag aac acg ctg ctc aac cag cta tgc gcc gat gcc	1248
Gly Gly Gly Cys Gln Asn Thr Leu Leu Asn Gln Leu Cys Ala Asp Ala	
405 410 415	
tgc ggt att cgg gtg atc gcc ggg cct gtt gaa gcc tgc acg ctc ggc	1296
Cys Gly Ile Arg Val Ile Ala Gly Pro Val Glu Ala Ser Thr Leu Gly	
420 425 430	
aat atc ggc atc cag tta atg acg ctg gat gaa ctc aac aat gtg gat	1344
Asn Ile Gly Ile Gln Leu Met Thr Leu Asp Glu Leu Asn Asn Val Asp	
435 440 445	
gat ttc cgt cag gtc gtc agc acc acc gcg aat ctg acc acc ttt acc	1392
Asp Phe Arg Gln Val Val Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Thr Phe Thr	
450 455 460	
cct aat cct gac agt gaa att gcc cac tat gtg gcg cag att cac tct	1440
Pro Asn Pro Asp Ser Glu Ile Ala His Tyr Val Ala Gln Ile His Ser	
465 470 475 480	

11

1470

aca cga cag aca aag gag ctt tgc gca tga  
 Thr Arg Gln Thr Lys Glu Leu Cys Ala  
 485

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 489

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 11

Met Thr Phe Arg Asn Cys Val Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Val Met Leu Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Cys Arg Ser Leu Thr Leu  
 20 25 30  
 Arg Glu Ile His Arg Phe Asn Asn Gly Leu His Ser Gln Asn Gly Tyr  
 35 40 45  
 Val Thr Trp Asp Val Asp Ser Leu Glu Ser Ala Ile Arg Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 Asn Lys Val Cys Glu Glu Gly Ile Arg Ile Asp Ser Ile Gly Ile Asp  
 65 70 75 80  
 Thr Trp Gly Val Asp Phe Val Leu Leu Asp Gln Gln Gly Gln Arg Val  
 85 90 95  
 Gly Leu Pro Val Ala Tyr Arg Asp Ser Arg Thr Asn Gly Leu Met Ala  
 100 105 110  
 Gln Ala Gln Gln Gln Leu Gly Lys Arg Asp Ile Tyr Gln Arg Ser Gly  
 115 120 125  
 Ile Gln Phe Leu Pro Phe Asn Thr Leu Tyr Gln Leu Arg Ala Leu Thr  
 130 135 140  
 Glu Gln Gln Pro Glu Leu Ile Pro His Ile Ala His Ala Leu Leu Met  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Tyr Phe Ser Tyr Arg Leu Thr Gly Lys Met Asn Trp Glu Tyr  
 165 170 175  
 Thr Asn Ala Thr Thr Thr Gln Leu Val Asn Ile Asn Ser Asp Asp Trp  
 180 185 190  
 Asp Glu Ser Leu Leu Ala Trp Ser Gly Ala Asn Lys Ala Trp Phe Gly  
 195 200 205  
 Arg Pro Thr His Pro Gly Asn Val Ile Gly His Trp Ile Cys Pro Gln  
 210 215 220  
 Gly Asn Glu Ile Pro Val Val Ala Val Ala Ser His Asp Thr Ala Ser  
 225 230 235 240  
 Ala Val Ile Ala Ser Pro Leu Asn Gly Ser Arg Ala Ala Tyr Leu Ser  
 245 250 255  
 Ser Gly Thr Trp Ser Leu Met Gly Phe Glu Ser Gln Thr Pro Phe Thr  
 260 265 270  
 Asn Asp Thr Ala Leu Ala Ala Asn Ile Thr Asn Glu Gly Gly Ala Glu  
 275 280 285  
 Gly Arg Tyr Arg Val Leu Lys Asn Ile Met Gly Leu Trp Leu Leu Gln  
 290 295 300  
 Arg Val Leu Gln Glu Gln Gln Ile Asn Asp Leu Pro Ala Leu Ile Ser  
 305 310 315 320

12

Ala Thr Gln Ala Leu Pro Ala Cys Arg Phe Ile Ile Asn Pro Asn Asp  
 325 330 335  
 Asp Arg Phe Ile Asn Pro Glu Thr Met Cys Ser Glu Ile Gln Ala Ala  
 340 345 350  
 Cys Arg Glu Thr Ala Gln Pro Ile Pro Glu Ser Asp Ala Glu Leu Ala  
 355 360 365  
 Arg Cys Ile Phe Asp Ser Leu Ala Leu Tyr Ala Asp Val Leu His  
 370 375 380  
 Glu Leu Ala Gln Leu Arg Gly Glu Asp Phe Ser Gln Leu His Ile Val  
 385 390 395 400  
 Gly Gly Gly Cys Gln Asn Thr Leu Leu Asn Gln Leu Cys Ala Asp Ala  
 405 410 415  
 Cys Gly Ile Arg Val Ile Ala Gly Pro Val Glu Ala Ser Thr Leu Gly  
 420 425 430  
 Asn Ile Gly Ile Gln Leu Met Thr Leu Asp Glu Leu Asn Asn Val Asp  
 435 440 445  
 Asp Phe Arg Gln Val Val Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Thr Phe Thr  
 450 455 460  
 Pro Asn Pro Asp Ser Glu Ile Ala His Tyr Val Ala Gln Ile His Ser  
 465 470 475 480  
 Thr Arg Gln Thr Lys Glu Leu Cys Ala  
 485

<210> 12

<211> 825

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(822)

<223> coding for rhaD (rhamnulose-phosphate aldolase)

<400> 12

atg caa aac att act cag tcc tgg ttt gtc cag gga atg atc aaa gcc 48  
 Met Gln Asn Ile Thr Gln Ser Trp Phe Val Gln Gly Met Ile Lys Ala  
 1 5 10 15  
 acc acc gac gcc tgg ctg aaa ggc tgg gat gag cgc aac ggc ggc aac 96  
 Thr Thr Asp Ala Trp Leu Lys Gly Trp Asp Glu Arg Asn Gly Gly Asn  
 20 25 30  
 ctg acg cta cgc ctg gat gac gcc gat atc gca cca tat cac gac aat 144  
 Leu Thr Leu Arg Leu Asp Asp Ala Asp Ile Ala Pro Tyr His Asp Asn  
 35 40 45  
 ttc cac caa caa ccg cgc tat atc ccg ctc agc cag ccc atg cct tta 192  
 Phe His Gln Gln Pro Arg Tyr Ile Pro Leu Ser Gln Pro Met Pro Leu  
 50 55 60  
 ctg gca aat aca ccg ttt att gtc acc ggc tcg ggc aaa ttc ttc cgt 240  
 Leu Ala Asn Thr Pro Phe Ile Val Thr Gly Ser Gly Lys Phe Phe Arg  
 65 70 75 80  
 aac gtc cag ctt gat cct gcg gct aac tta ggc atc gta aaa gtc gac 288  
 Asn Val Gln Leu Asp Pro Ala Ala Asn Leu Gly Ile Val Lys Val Asp  
 85 90 95

## 13

agc gac ggc gcg ggc tac cac att ctt tgg ggg tta acc aac gaa gcc 336  
 Ser Asp Gly Ala Gly Tyr His Ile Leu Trp Gly Leu Thr Asn Glu Ala  
 100 105 110

gtc ccc act tcc gaa ctt ccg gct cac ttc ctt tcc cac tgc gag cgc 384  
 Val Pro Thr Ser Glu Leu Pro Ala His Phe Leu Ser His Cys Glu Arg  
 115 120 125

att aaa gcc acc aac ggc aaa gat cgg gtg atc atg cac tgc cac gcc 432  
 Ile Lys Ala Thr Asn Gly Lys Asp Arg Val Ile Met His Cys His Ala  
 130 135 140

acc aac ctg atc gcc ctc acc tat gta ctt gaa aac gac acc gcg gtc 480  
 Thr Asn Leu Ile Ala Leu Thr Tyr Val Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val  
 145 150 155 160

ttc act cgc caa ctg tgg gaa ggc agc acc gag tgt ctg gtg gta ttc 528  
 Phe Thr Arg Gln Leu Trp Glu Gly Ser Thr Glu Cys Leu Val Val Phe  
 165 170 175

ccg gat ggc gtt ggc att ttg ccg tgg atg gtg ccc ggc acg gac gaa 576  
 Pro Asp Gly Val Gly Ile Leu Pro Trp Met Val Pro Gly Thr Asp Glu  
 180 185 190

atc ggc cag gcg acc gca caa gag atg caa aaa cat tcg ctg gtg ttg 624  
 Ile Gly Gln Ala Thr Ala Gln Glu Met Gln Lys His Ser Leu Val Leu  
 195 200 205

tgg ccc ttc cac ggc gtc ttc ggc agc gga ccg acg ctg gat gaa acc 672  
 Trp Pro Phe His Gly Val Phe Gly Ser Gly Pro Thr Leu Asp Glu Thr  
 210 215 220

ttc ggt tta atc gac acc gca gaa aaa tca gca caa gta tta gtg aag 720  
 Phe Gly Leu Ile Asp Thr Ala Glu Lys Ser Ala Gln Val Leu Val Lys  
 225 230 235 240

gtt tat tcg atg ggc ggc atg aaa cag acc atc agc cgt gaa gag ttg 768  
 Val Tyr Ser Met Gly Gly Met Lys Gln Thr Ile Ser Arg Glu Glu Leu  
 245 250 255

ata gcg ctc ggc aag cgt ttc ggc gtt acg cca ctc gcc agt gcg ctg 816  
 Ile Ala Leu Gly Lys Arg Phe Gly Val Thr Pro Leu Ala Ser Ala Leu  
 260 265 270

gcg ctg taa 825  
 Ala Leu

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 13

Met Gln Asn Ile Thr Gln Ser Trp Phe Val Gln Gly Met Ile Lys Ala  
 1 5 10 15

Thr Thr Asp Ala Trp Leu Lys Gly Trp Asp Glu Arg Asn Gly Gly Asn  
 20 25 30

Leu Thr Leu Arg Leu Asp Asp Ala Asp Ile Ala Pro Tyr His Asp Asn  
 35 40 45

Phe His Gln Gln Pro Arg Tyr Ile Pro Leu Ser Gln Pro Met Pro Leu  
 50 55 60

Leu Ala Asn Thr Pro Phe Ile Val Thr Gly Ser Gly Lys Phe Phe Arg  
 65 70 75 80

## 14

Asn Val Gln Leu Asp Pro Ala Ala Asn Leu Gly Ile Val Lys Val Asp  
 85 90 95  
 Ser Asp Gly Ala Gly Tyr His Ile Leu Trp Gly Leu Thr Asn Glu Ala  
 100 105 110  
 Val Pro Thr Ser Glu Leu Pro Ala His Phe Leu Ser His Cys Glu Arg  
 115 120 125  
 Ile Lys Ala Thr Asn Gly Lys Asp Arg Val Ile Met His Cys His Ala  
 130 135 140  
 Thr Asn Leu Ile Ala Leu Thr Tyr Val Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Arg Gln Leu Trp Glu Gly Ser Thr Glu Cys Leu Val Val Phe  
 165 170 175  
 Pro Asp Gly Val Gly Ile Leu Pro Trp Met Val Pro Gly Thr Asp Glu  
 180 185 190  
 Ile Gly Gln Ala Thr Ala Gln Glu Met Gln Lys His Ser Leu Val Leu  
 195 200 205  
 Trp Pro Phe His Gly Val Phe Gly Ser Gly Pro Thr Leu Asp Glu Thr  
 210 215 220  
 Phe Gly Leu Ile Asp Thr Ala Glu Lys Ser Ala Gln Val Leu Val Lys  
 225 230 235 240  
 Val Tyr Ser Met Gly Gly Met Lys Gln Thr Ile Ser Arg Glu Glu Leu  
 245 250 255  
 Ile Ala Leu Gly Lys Arg Phe Gly Val Thr Pro Leu Ala Ser Ala Leu  
 260 265 270  
 Ala Leu

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 939

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(936)

&lt;223&gt; coding for rhaR (positive regulator for rhaRS operon)

&lt;400&gt; 14

atg gct ttc tgc aat aac gcg aat ctt ctc aac gta ttt gta cgc cat 48  
 Met Ala Phe Cys Asn Asn Ala Asn Leu Leu Asn Val Phe Val Arg His  
 1 5 10 15  
 att gcg aat aat caa ctt cgt tct ctg gcc gag gta gcc acg gtg gcg 96  
 Ile Ala Asn Asn Gln Leu Arg Ser Leu Ala Glu Val Ala Thr Val Ala  
 20 25 30  
 cat cag tta aaa ctt ctc aaa gat gat ttt ttt gcc agc gac cag cag 144  
 His Gln Leu Lys Leu Leu Lys Asp Asp Phe Phe Ala Ser Asp Gln Gln  
 35 40 45  
 gca gtc gct gtg gct gac cgt tat ccg caa gat gtc ttt gct gaa cat 192  
 Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Tyr Pro Gln Asp Val Phe Ala Glu His  
 50 55 60

## 15

aca	cat	gat	ttt	tgt	gag	ctg	gtg	att	gtc	tgg	cgc	ggt	aat	ggc	ctg	240
Thr	His	Asp	Phe	Cys	Glu	Leu	Val	Ile	Val	Trp	Arg	Gly	Asn	Gly	Leu	
65					70					75					80	
cat	gta	ctc	aac	gat	cgc	cct	tat	cgc	att	acc	cgt	ggc	gat	ctc	ttt	288
His	Val	Leu	Asn	Asp	Arg	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Arg	Gly	Asp	Leu	Phe	
				85					90					95		
tac	att	cat	gct	gac	gat	aaa	cac	tcc	tac	gct	tcc	gtt	aac	gat	ctg	336
Tyr	Ile	His	Ala	Asp	Asp	Lys	His	Ser	Tyr	Ala	Ser	Val	Asn	Asp	Leu	
			100					105					110			
gtt	ttg	cag	aat	att	att	tat	tgc	ccg	gag	cgt	ctg	aag	ctg	aat	ctt	384
Val	Leu	Gln	Asn	Ile	Ile	Tyr	Cys	Pro	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Asn	Leu	
		115					120					125				
gac	tgg	cag	ggg	gcg	att	ccg	gga	ttt	aac	gcc	agc	gca	ggg	caa	cca	432
Asp	Trp	Gln	Gly	Ala	Ile	Pro	Gly	Phe	Asn	Ala	Ser	Ala	Gly	Gln	Pro	
130						135					140					
cac	tgg	cgc	tta	ggt	agc	atg	ggg	atg	gcg	cag	gcg	cgg	cag	gtt	atc	480
His	Trp	Arg	Leu	Gly	Ser	Met	Gly	Met	Ala	Gln	Ala	Arg	Gln	Val	Ile	
145					150					155					160	
ggt	cag	ctt	gag	cat	gaa	agt	agt	cag	cat	gtg	ccg	ttt	gct	aac	gaa	528
Gly	Gln	Leu	Glu	His	Glu	Ser	Ser	Gln	His	Val	Pro	Phe	Ala	Asn	Glu	
				165					170					175		
atg	gct	gag	ttg	ctg	ttc	ggg	cag	ttg	gtg	atg	ttg	ctg	aat	cgc	cat	576
Met	Ala	Glu	Leu	Leu	Phe	Gly	Gln	Leu	Val	Met	Leu	Leu	Asn	Arg	His	
			180					185					190			
cgt	tac	acc	agt	gat	tcg	ttg	ccg	cca	aca	tcc	agc	gaa	acg	ttg	ctg	624
Arg	Tyr	Thr	Ser	Asp	Ser	Leu	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Leu	
		195					200					205				
gat	aag	ctg	att	acc	cgg	ctg	gcg	gct	agc	ctg	aaa	agt	ccc	ttt	gcg	672
Asp	Lys	Leu	Ile	Thr	Arg	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Phe	Ala	
210						215					220					
ctg	gat	aaa	ttt	tgt	gat	gag	gca	tcg	tgc	agt	gag	cgc	gtt	ttg	cgt	720
Leu	Asp	Lys	Phe	Cys	Asp	Glu	Ala	Ser	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Arg	
225					230					235					240	
cag	caa	ttt	cgc	cag	cag	act	gga	atg	acc	atc	aat	caa	tat	ctg	cga	768
Gln	Gln	Phe	Arg	Gln	Gln	Thr	Gly	Met	Thr	Ile	Asn	Gln	Tyr	Leu	Arg	
				245					250					255		
cag	gtc	aga	gtg	tgt	cat	gcg	caa	tat	ctt	ctc	cag	cat	agc	cgc	ctg	816
Gln	Val	Arg	Val	Cys	His	Ala	Gln	Tyr	Leu	Leu	Gln	His	Ser	Arg	Leu	
			260					265					270			
tta	atc	agt	gat	att	tcg	acc	gaa	tgt	ggc	ttt	gaa	gat	agt	aac	tat	864
Leu	Ile	Ser	Asp	Ile	Ser	Thr	Glu	Cys	Gly	Phe	Glu	Asp	Ser	Asn	Tyr	
		275					280					285				
ttt	tcg	gtg	gtg	ttt	acc	cgg	gaa	acc	ggg	atg	acg	ccc	agc	cag	tgg	912
Phe	Ser	Val	Val	Phe	Thr	Arg	Glu	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Ser	Gln	Trp	
		290				295					300					
cgt	cat	ctc	aat	tcg	cag	aaa	gat	taa								939
Arg	His	Leu	Asn	Ser	Gln	Lys	Asp									
305					310											

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 312

16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 15

Met	Ala	Phe	Cys	Asn	Asn	Ala	Asn	Leu	Leu	Asn	Val	Phe	Val	Arg	His
1				5				10						15	
Ile	Ala	Asn	Asn	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Ala	Thr	Val	Ala
		20						25					30		
His	Gln	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Phe	Phe	Ala	Ser	Asp	Gln	Gln
	35						40					45			
Ala	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Arg	Tyr	Pro	Gln	Asp	Val	Phe	Ala	Glu	His
	50					55					60				
Thr	His	Asp	Phe	Cys	Glu	Leu	Val	Ile	Val	Trp	Arg	Gly	Asn	Gly	Leu
65					70					75					80
His	Val	Leu	Asn	Asp	Arg	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Arg	Gly	Asp	Leu	Phe
			85						90					95	
Tyr	Ile	His	Ala	Asp	Asp	Lys	His	Ser	Tyr	Ala	Ser	Val	Asn	Asp	Leu
			100					105					110		
Val	Leu	Gln	Asn	Ile	Ile	Tyr	Cys	Pro	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Asn	Leu
		115					120					125			
Asp	Trp	Gln	Gly	Ala	Ile	Pro	Gly	Phe	Asn	Ala	Ser	Ala	Gly	Gln	Pro
	130					135						140			
His	Trp	Arg	Leu	Gly	Ser	Met	Gly	Met	Ala	Gln	Ala	Arg	Gln	Val	Ile
145					150					155					160
Gly	Gln	Leu	Glu	His	Glu	Ser	Ser	Gln	His	Val	Pro	Phe	Ala	Asn	Glu
			165						170					175	
Met	Ala	Glu	Leu	Leu	Phe	Gly	Gln	Leu	Val	Met	Leu	Leu	Asn	Arg	His
		180						185					190		
Arg	Tyr	Thr	Ser	Asp	Ser	Leu	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Leu
	195						200					205			
Asp	Lys	Leu	Ile	Thr	Arg	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Phe	Ala
	210					215					220				
Leu	Asp	Lys	Phe	Cys	Asp	Glu	Ala	Ser	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Arg
225					230					235					240
Gln	Gln	Phe	Arg	Gln	Gln	Thr	Gly	Met	Thr	Ile	Asn	Gln	Tyr	Leu	Arg
				245					250					255	
Gln	Val	Arg	Val	Cys	His	Ala	Gln	Tyr	Leu	Leu	Gln	His	Ser	Arg	Leu
		260						265					270		
Leu	Ile	Ser	Asp	Ile	Ser	Thr	Glu	Cys	Gly	Phe	Glu	Asp	Ser	Asn	Tyr
	275						280					285			
Phe	Ser	Val	Val	Phe	Thr	Arg	Glu	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Ser	Gln	Trp
	290					295					300				
Arg	His	Leu	Asn	Ser	Gln	Lys	Asp								
305					310										

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 837

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(834)

&lt;223&gt; coding for rhaS (positive regulator of rhaBAD operon)

&lt;400&gt; 16

atg acc gta tta cat agt gtg gat ttt ttt ccg tct ggt aac gcg tcc	48
Met Thr Val Leu His Ser Val Asp Phe Phe Pro Ser Gly Asn Ala Ser	
1 5 10 15	
gtg gcg ata gaa ccc cgg ctc ccg cag gcg gat ttt cct gaa cat cat	96
Val Ala Ile Glu Pro Arg Leu Pro Gln Ala Asp Phe Pro Glu His His	
20 25 30	
cat gat ttt cat gaa att gtg att gtc gaa cat ggc acg ggt att cat	144
His Asp Phe His Glu Ile Val Ile Val Glu His Gly Thr Gly Ile His	
35 40 45	
gtg ttt aat ggg cag ccc tat acc atc acc ggt ggc acg gtc tgt ttc	192
Val Phe Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Ile Thr Gly Gly Thr Val Cys Phe	
50 55 60	
gta cgc gat cat gat cgg cat ctg tat gaa cat acc gat aat ctg tgt	240
Val Arg Asp His Asp Arg His Leu Tyr Glu His Thr Asp Asn Leu Cys	
65 70 75 80	
ctg acc aat gtg ctg tat cgc tcg ccg gat cga ttt cag ttt ctc gcc	288
Leu Thr Asn Val Leu Tyr Arg Ser Pro Asp Arg Phe Gln Phe Leu Ala	
85 90 95	
ggg ctg aat cag ttg ctg cca caa gag ctg gat ggg cag tat ccg tct	336
Gly Leu Asn Gln Leu Leu Pro Gln Glu Leu Asp Gly Gln Tyr Pro Ser	
100 105 110	
cac tgg cgc gtt aac cac agc gta ttg cag cag gtg cga cag ctg gtt	384
His Trp Arg Val Asn His Ser Val Leu Gln Gln Val Arg Gln Leu Val	
115 120 125	
gca cag atg gaa cag cag gaa ggg gaa aat gat tta ccc tcg acc gcc	432
Ala Gln Met Glu Gln Gln Glu Gly Glu Asn Asp Leu Pro Ser Thr Ala	
130 135 140	
agt cgc gag atc ttg ttt atg caa tta ctg ctc ttg ctg cgt aaa agc	480
Ser Arg Glu Ile Leu Phe Met Gln Leu Leu Leu Leu Arg Lys Ser	
145 150 155 160	
agt ttg cag gag aac ctg gaa aac agc gca tca cgt ctc aac ttg ctt	528
Ser Leu Gln Glu Asn Leu Glu Asn Ser Ala Ser Arg Leu Asn Leu Leu	
165 170 175	
ctg gcc tgg ctg gag gac cat ttt gcc gat gag gtg aat tgg gat gcc	576
Leu Ala Trp Leu Glu Asp His Phe Ala Asp Glu Val Asn Trp Asp Ala	
180 185 190	
gtg gcg gat caa ttt tct ctt tca ctg cgt acg cta cat cgg cag ctt	624
Val Ala Asp Gln Phe Ser Leu Ser Leu Arg Thr Leu His Arg Gln Leu	
195 200 205	
aag cag caa acg gga ctg acg cct cag cga tac ctg aac cgc ctg cga	672
Lys Gln Gln Thr Gly Leu Thr Pro Gln Arg Tyr Leu Asn Arg Leu Arg	
210 215 220	
ctg atg aaa gcc cga cat ctg cta cgc cac agc gag gcc agc gtt act	720
Leu Met Lys Ala Arg His Leu Leu Arg His Ser Glu Ala Ser Val Thr	
225 230 235 240	

18

gac atc gcc tat cgc tgt gga ttc agc gac agt aac cac ttt tcg acg 768  
 Asp Ile Ala Tyr Arg Cys Gly Phe Ser Asp Ser Asn His Phe Ser Thr  
 245 250 255

ctt ttt cgc cga gag ttt aac tgg tca ccg cgt gat att cgc cag gga 816  
 Leu Phe Arg Arg Glu Phe Asn Trp Ser Pro Arg Asp Ile Arg Gln Gly  
 260 265 270

cgg gat ggc ttt ctg caa taa 837  
 Arg Asp Gly Phe Leu Gln  
 275

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 278

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 17

Met Thr Val Leu His Ser Val Asp Phe Phe Pro Ser Gly Asn Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ala Ile Glu Pro Arg Leu Pro Gln Ala Asp Phe Pro Glu His His  
 20 25 30

His Asp Phe His Glu Ile Val Ile Val Glu His Gly Thr Gly Ile His  
 35 40 45

Val Phe Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Ile Thr Gly Gly Thr Val Cys Phe  
 50 55 60

Val Arg Asp His Asp Arg His Leu Tyr Glu His Thr Asp Asn Leu Cys  
 65 70 75 80

Leu Thr Asn Val Leu Tyr Arg Ser Pro Asp Arg Phe Gln Phe Leu Ala  
 85 90 95

Gly Leu Asn Gln Leu Leu Pro Gln Glu Leu Asp Gly Gln Tyr Pro Ser  
 100 105 110

His Trp Arg Val Asn His Ser Val Leu Gln Gln Val Arg Gln Leu Val  
 115 120 125

Ala Gln Met Glu Gln Gln Glu Gly Glu Asn Asp Leu Pro Ser Thr Ala  
 130 135 140

Ser Arg Glu Ile Leu Phe Met Gln Leu Leu Leu Leu Leu Arg Lys Ser  
 145 150 155 160

Ser Leu Gln Glu Asn Leu Glu Asn Ser Ala Ser Arg Leu Asn Leu Leu  
 165 170 175

Leu Ala Trp Leu Glu Asp His Phe Ala Asp Glu Val Asn Trp Asp Ala  
 180 185 190

Val Ala Asp Gln Phe Ser Leu Ser Leu Arg Thr Leu His Arg Gln Leu  
 195 200 205

Lys Gln Gln Thr Gly Leu Thr Pro Gln Arg Tyr Leu Asn Arg Leu Arg  
 210 215 220

Leu Met Lys Ala Arg His Leu Leu Arg His Ser Glu Ala Ser Val Thr  
 225 230 235 240

Asp Ile Ala Tyr Arg Cys Gly Phe Ser Asp Ser Asn His Phe Ser Thr  
 245 250 255

Leu Phe Arg Arg Glu Phe Asn Trp Ser Pro Arg Asp Ile Arg Gln Gly  
 260 265 270

Arg Asp Gly Phe Leu Gln  
275

<210> 18

<211> 1035

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

<223> coding for rhaT (rhamnose transport protein).

<400> 18

atg agt aac gcg att acg atg ggg ata ttt tgg cat ttg atc ggc gcg	48
Met Ser Asn Ala Ile Thr Met Gly Ile Phe Trp His Leu Ile Gly Ala	
1 5 10 15	
gcc agt gca gcc tgt ttt tac gct ccg ttc aaa aaa gta aaa aaa tgg	96
Ala Ser Ala Ala Cys Phe Tyr Ala Pro Phe Lys Lys Val Lys Lys Trp	
20 25 30	
tca tgg gaa acc atg tgg tca gtc ggt ggg att gtt tgc tgg att att	144
Ser Trp Glu Thr Met Trp Ser Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Ile Ile	
35 40 45	
ctg ccg tgg gcc atc agc gcc ctg tta cta ccg aat ttc tgg gcg tat	192
Leu Pro Trp Ala Ile Ser Ala Leu Leu Leu Pro Asn Phe Trp Ala Tyr	
50 55 60	
tac agc tcg ttt agt ctc tct acg cga ctg cct gtt ttt ctg ttc ggc	240
Tyr Ser Ser Phe Ser Leu Ser Thr Arg Leu Pro Val Phe Leu Phe Gly	
65 70 75 80	
gct atg tgg ggg atc ggt aat atc aac tac ggc ctg acc atg cgt tat	288
Ala Met Trp Gly Ile Gly Asn Ile Asn Tyr Gly Leu Thr Met Arg Tyr	
85 90 95	
ctc ggc atg tcg atg gga att ggc atc gcc att ggc att acg ttg att	336
Leu Gly Met Ser Met Gly Ile Gly Ile Ala Ile Gly Ile Thr Leu Ile	
100 105 110	
gtc ggt acg ctg atg acg cca att atc aac ggc aat ttc gat gtg ttg	384
Val Gly Thr Leu Met Thr Pro Ile Ile Asn Gly Asn Phe Asp Val Leu	
115 120 125	
att agc acc gaa ggc gga cgc atg acg ttg ctc ggc gtt ctg gtg gcg	432
Ile Ser Thr Glu Gly Gly Arg Met Thr Leu Leu Gly Val Leu Val Ala	
130 135 140	
ctg att ggc gta ggg att gta act cgc gcc ggg cag ttg aaa gag cgc	480
Leu Ile Gly Val Gly Ile Val Thr Arg Ala Gly Gln Leu Lys Glu Arg	
145 150 155 160	
aag atg ggc att aaa gcc gaa gag ttc aat ctg aaa aaa ggg ctg gtg	528
Lys Met Gly Ile Lys Ala Glu Glu Phe Asn Leu Lys Lys Gly Leu Val	
165 170 175	
ctg gcg gtg atg tgc ggc att ttc tct gcc ggg atg tcc ttt gcg atg	576
Leu Ala Val Met Cys Gly Ile Phe Ser Ala Gly Met Ser Phe Ala Met	
180 185 190	
aac gcc gca aaa ccg atg cat gaa gcc gct gcc gca ctt ggc gtc gat	624
Asn Ala Ala Lys Pro Met His Glu Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val Asp	
195 200 205	

20

cca ctg tat gtc gct ctg cca agc tat gtt gtc atc atg ggc ggc ggc 672  
 Pro Leu Tyr Val Ala Leu Pro Ser Tyr Val Val Ile Met Gly Gly Gly  
 210 215 220

gcg atc att aac ctc ggt ttc tgt ttt att cgt ctg gca aaa gtg aag 720  
 Ala Ile Ile Asn Leu Gly Phe Cys Phe Ile Arg Leu Ala Lys Val Lys  
 225 230 235 240

gat ttg tcg cta aaa gcc gac ttc tcg ctg gca aaa tcg ctg atc att 768  
 Asp Leu Ser Leu Lys Ala Asp Phe Ser Leu Ala Lys Ser Leu Ile Ile  
 245 250 255

cac aat gtg tta ctc tcg aca ctg ggc ggg ttg atg tgg tat ctg caa 816  
 His Asn Val Leu Leu Ser Thr Leu Gly Gly Leu Met Trp Tyr Leu Gln  
 260 265 270

ttc ttt ttc tat gcc tgg ggc cac gcc cgc att ccg gcg cag tat gac 864  
 Phe Phe Phe Tyr Ala Trp Gly His Ala Arg Ile Pro Ala Gln Tyr Asp  
 275 280 285

tac atc agt tgg atg ctg cat atg agt ttc tat gta ttg tgc ggc ggt 912  
 Tyr Ile Ser Trp Met Leu His Met Ser Phe Tyr Val Leu Cys Gly Gly  
 290 295 300

atc gtc ggc ctg gtg ctg aaa gag tgg aac aat gca gga cgc cgt ccg 960  
 Ile Val Gly Leu Val Leu Lys Glu Trp Asn Asn Ala Gly Arg Arg Pro  
 305 310 315 320

gta acg gtg ttg agc ctc ggt tgt gtg gtg att att gtc gcc gct aac 1008  
 Val Thr Val Leu Ser Leu Gly Cys Val Val Ile Ile Val Ala Ala Asn  
 325 330 335

atc gtc ggc atc ggc atg gcg aat taa 1035  
 Ile Val Gly Ile Gly Met Ala Asn  
 340

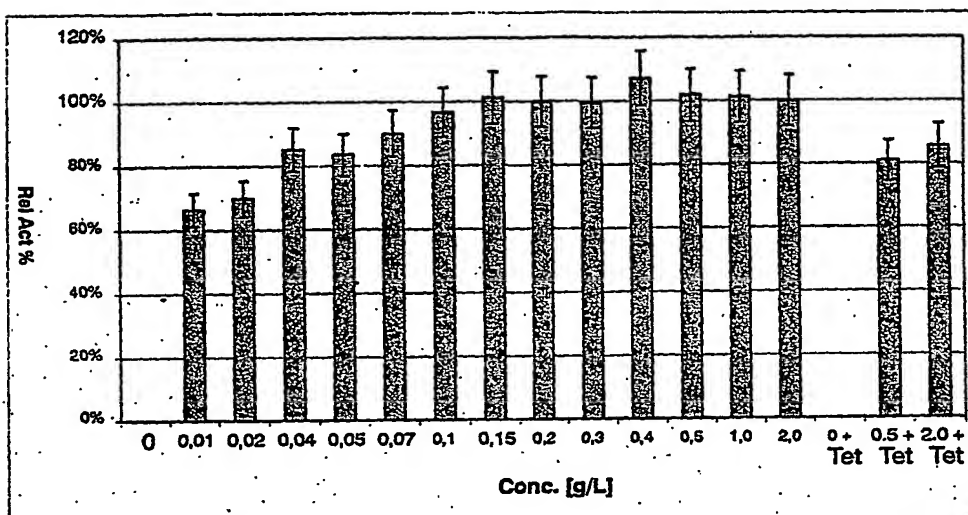
<210> 19  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 19  
 Met Ser Asn Ala Ile Thr Met Gly Ile Phe Trp His Leu Ile Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Ala Ala Cys Phe Tyr Ala Pro Phe Lys Lys Val Lys Lys Trp  
 20 25 30  
 Ser Trp Glu Thr Met Trp Ser Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Ile Ile  
 35 40 45  
 Leu Pro Trp Ala Ile Ser Ala Leu Leu Leu Pro Asn Phe Trp Ala Tyr  
 50 55 60  
 Tyr Ser Ser Phe Ser Leu Ser Thr Arg Leu Pro Val Phe Leu Phe Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Met Trp Gly Ile Gly Asn Ile Asn Tyr Gly Leu Thr Met Arg Tyr  
 85 90 95  
 Leu Gly Met Ser Met Gly Ile Gly Ile Ala Ile Gly Ile Thr Leu Ile  
 100 105 110  
 Val Gly Thr Leu Met Thr Pro Ile Ile Asn Gly Asn Phe Asp Val Leu  
 115 120 125  
 Ile Ser Thr Glu Gly Gly Arg Met Thr Leu Leu Gly Val Leu Val Ala  
 130 135 140

21

Leu Ile Gly Val Gly Ile Val Thr Arg Ala Gly Gln Leu Lys Glu Arg  
145 150 155 160  
Lys Met Gly Ile Lys Ala Glu Glu Phe Asn Leu Lys Lys Gly Leu Val  
165 170 175  
Leu Ala Val Met Cys Gly Ile Phe Ser Ala Gly Met Ser Phe Ala Met  
180 185 190  
Asn Ala Ala Lys Pro Met His Glu Ala Ala Ala Leu Gly Val Asp  
195 200 205  
Pro Leu Tyr Val Ala Leu Pro Ser Tyr Val Val Ile Met Gly Gly Gly  
210 215 220  
Ala Ile Ile Asn Leu Gly Phe Cys Phe Ile Arg Leu Ala Lys Val Lys  
225 230 235 240  
Asp Leu Ser Leu Lys Ala Asp Phe Ser Leu Ala Lys Ser Leu Ile Ile  
245 250 255  
His Asn Val Leu Leu Ser Thr Leu Gly Gly Leu Met Trp Tyr Leu Gln  
260 265 270  
Phe Phe Phe Tyr Ala Trp Gly His Ala Arg Ile Pro Ala Gln Tyr Asp  
275 280 285  
Tyr Ile Ser Trp Met Leu His Met Ser Phe Tyr Val Leu Cys Gly Gly  
290 295 300  
Ile Val Gly Leu Val Leu Lys Glu Trp Asn Asn Ala Gly Arg Arg Pro  
305 310 315 320  
Val Thr Val Leu Ser Leu Gly Cys Val Val Ile Ile Val Ala Ala Asn  
325 330 335  
Ile Val Gly Ile Gly Met Ala Asn  
340

A



B

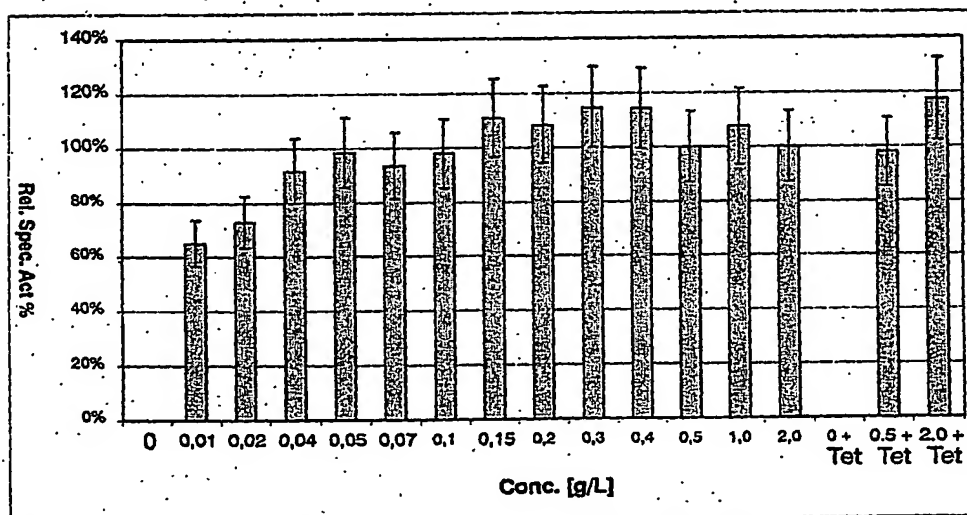


Fig. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**